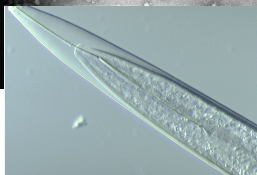
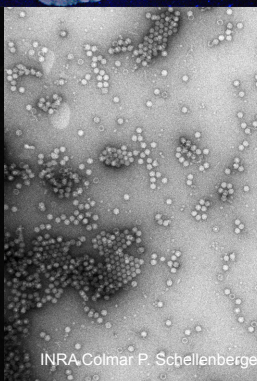


la Vigne, plante d'intérêt économique : ses principaux virus et étude du cas particulier de la maladie du court-noué ; approche systémique impliquant l'approche OGM

M2 UDS - Spécialité Biologie et Valorisation des Plantes
22 novembre 2011
Olivier LEMAIRE



Presentation of INRA

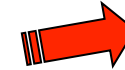
Institut National de la Recherche Agronomique

8,850 employees - 4,200 scientists & engineers

14 research departments

257 research units

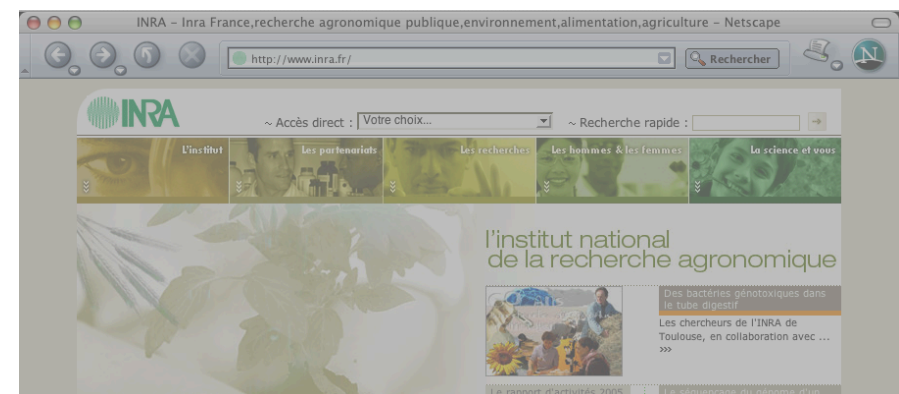
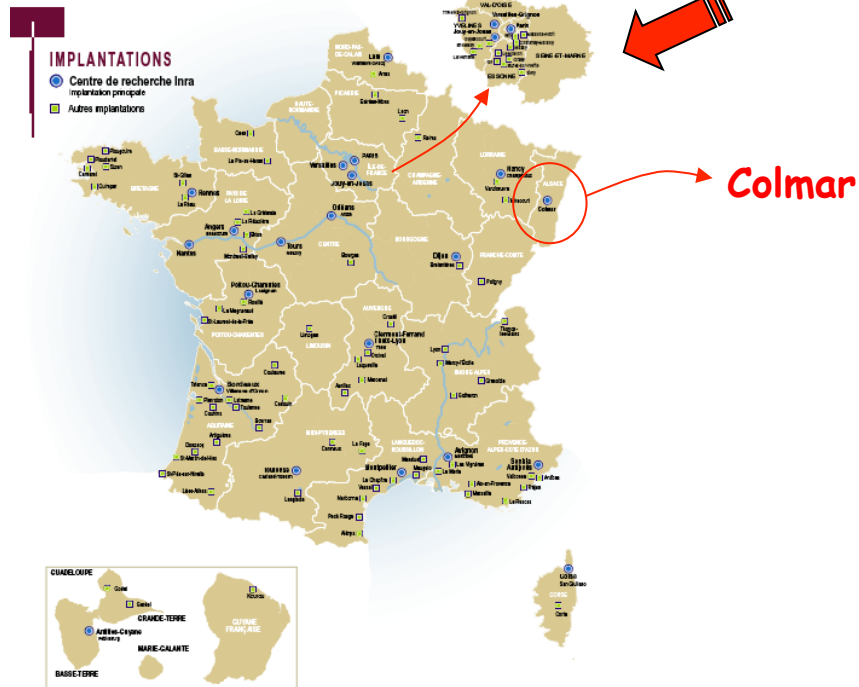
21 research centers



ALIMENTATION HUMAINE
BIOLOGIE VÉGÉTALE
CARACTÉRISATION ET ÉLABORATION DES PRODUITS ISSUS DE L'AGRICULTURE
ÉCOLOGIE DES FORÊTS, PRAIRIES ET MILIEUX AQUATIQUES
ENVIRONNEMENT ET AGRONOMIE
GÉNÉTIQUE ANIMALE
GÉNÉTIQUE ET AMÉLIORATION DES PLANTES
MATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE APPLIQUÉES
MICROBIOLOGIE ET CHÂÎNE ALIMENTAIRE
PHYSIOLOGIE ANIMALE ET SYSTÈMES D'ÉLEVAGE
SANTÉ ANIMALE
SANTÉ DES PLANTES ET ENVIRONNEMENT
SCIENCES POUR L'ACTION ET LE DÉVELOPPEMENT
SCIENCES SOCIALES, AGRICULTURE ET ALIMENTATION, ESPACE ET ENVIRONNEMENT

Plant Health and Environment

<www.inra.fr> & <www.international.inra.fr>



INRA Colmar

Unit « Santé de la Vigne et Qualité du Vin »
(Grapevine Health and Wine Quality)
ca. 50 permanent employees
INRA and Université de Strasbourg (UDS)

3 research groups:

- Grapevine genetics and breeding
- Grapevine secondary metabolism
- **Virology & Vection**



Virology & Vection - ViVe

4 scientists, 1 associate professor, 7 engineers, 7 technicians, 6 PhD, 2 post-docs

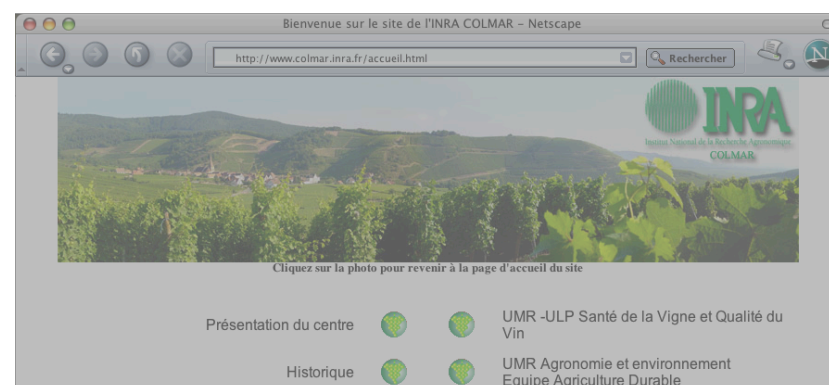
Main topics:

- grapevine resistance to fanleaf disease
- etiology and detection methodology
- virus transmission by invertebrates



© L'Alsace

<www.colmar.inra.fr>

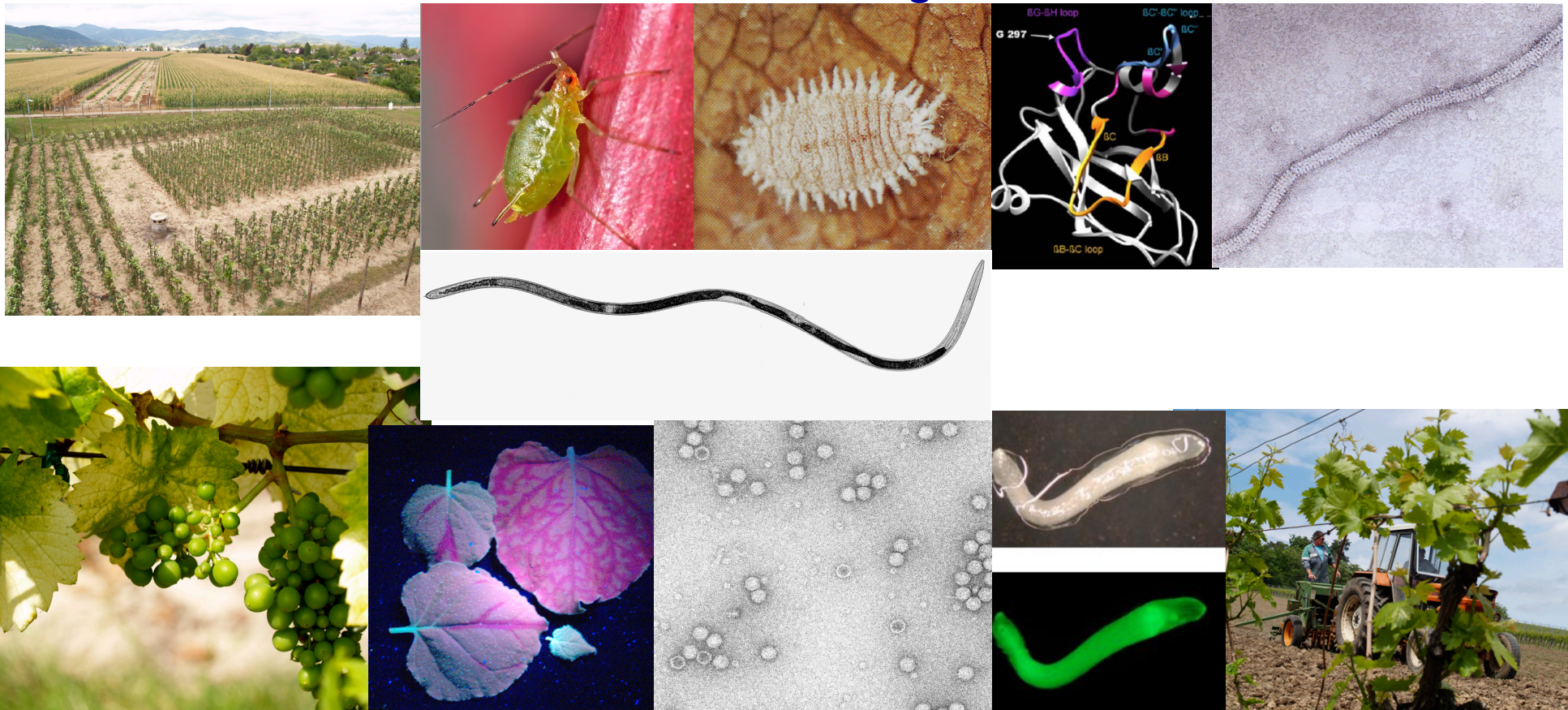


Equipe Virologie & Vection

Biologie intégrative des interactions plante–virus–vecteurs

A- Etudes génériques sur les virus : leur biologie, leur transmission

B- La résistance par ARNi et induite par transgénèse : application au modèle GFLV–vigne



INRA

UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin



UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin

Direction : Frédérique Pelsy

CORRESPONDANTS		SERVICES COMMUNS	PLATEFORMES TECHNIQUES
ACP	Assurance Qualité Recherche	Métrologie	Secrétariat
Butterlin Gisèle (TR-INRA)	Prado Emilce (IE-INRA)	Gersch Sophie (TR-INRA)	Martin Agnès (TR-INRA)
Boissinot Sylvaine (TR-INRA)	Beuve Monique (IE-INRA)		
Claudel Patricia (TR-INRA)	Jaegli Nathalie (TR-INRA)		
Dumas Vincent (AI-INRA)	Marmonier Aurélie (AI-INRA)	Gestion Financière	
Jaegli Nathalie (TR-INRA)	Perrin Mireille (AI-INRA)	Bechler Marie Louise (TR-INRA)	
Perrin Mireille (AI-INRA)			
			Plateforme nationale de transgénèse vigne
			Masson Jean (DR-INRA)
			Perrin Mireille (AI-INRA)
			Gertz Claude (TR-INRA)
			Schmitt Carine (TR-INRA)
			Plateforme de transfert et d'innovation variétale
			Arnold Guillaume (AI-CIVA)

Résistance durable aux bioagresseurs	Métabolisme secondaire de la vigne Métabolisme des isoprenoïdes et qualité du vin	Virologie et vection
Merdinoglu Didier (DR-INRA) Chich Jean-François (CR-INRA) Mestre Pere (CR-INRA) Pelsy Frédérique (CR-INRA) Duchêne Eric (IR-INRA) Poutaraud Anne (IR-INRA) Schneider Christophe (IR-INRA) Wiedemann-Merdinoglu Sabine (IR-INRA) Prado Emilce (IE-INRA) Dumas Vincent (AI-INRA) Bevilacqua Lucie (TR-INRA) Blanc Sophie (TR-INRA) doctorante Butterlin Gisèle (TR-INRA) Heinrich-Coste Pascale (TR-INRA) Jaegli Nathalie (TR-INRA) Onimus Christine (TR-INRA) Piron Marie-Christine (TR-INRA) Dorne Marie-Annick (AT-INRA) Masson Raymond (AT-INRA) Peressotti Elisa (CDD)	Hugueney Philippe (DR-INRA) Fischer Marc (MCF-Université de Strasbourg) Baltenweck-Guyot Raymonde (IR-Université de Strasbourg) Claudel Patricia (TR-INRA) Renault Lauriane (TR-INRA) Riveill Geneviève (TR-INRA) Alais Anne (AT-INRA) Meyer Sophie (AT-INRA) Parage Claire (BTH) Ilg Andrea (post doc)	Brault Véronique (DR-INRA) Lemaire Olivier (DR-INRA) Masson Jean (DR-INRA) Herrbach Etienne (CR-INRA) Gacougnolle Isabelle (MCF-Université Haute Alsace) Demangeat Gérard (IR-INRA) Djennane Samia (IR-INRA) Beuve Monique (IE-INRA) Hommay Gérard (IE-INRA) Marmonier Aurélie (AI-INRA) Perrin Mireille (AI-INRA) Reinbold Catherine (AI-INRA) Vigne Emmanuelle (AI-INRA) Boissinot Sylvaine (TR-INRA) doctorante Erdringer Monique (TR-INRA) Gersch Sophie (TR-INRA) Gertz Claude (TR-INRA) Komar Véronique (TR-INRA) Schmitt Carine (TR-INRA) Wiss Louis (TR-INRA) Belval Lorène (BTH) Boubakri Hatem (BTH Tunisie) Hemmer Caroline (BTH) Hipper Clémence (BTH) Le Maguet Jean (BTH) Romon Marjorie (BTH) Rodriguez Medina Caren (post doc)

Equipe ViVe

7 IR-MCF-CR-DR
(4 HDR*)

6 AI-IE

7 TR + 1 mād

8 Thésards-post doc

* dont une en cours d'obtention

Métaprogramme

SMaCH
*Sustainable
Management
of Crop
Health*

CT3
Communauté/
paysage

CT2
Population/
espèce

CT1
Cellule/
individu

**Biologie intégrative des
interactions plante–virus–
vecteurs**

3 modèles

*Gestion intégrée de la
santé de la vigne
appliquée à ses
principaux virus et
vecteurs associés -*
GISV3

Généralités sur les virus de plante UCL

- http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=generalites

Qu'est-ce qu'un phytovirus ? Quelques rappels

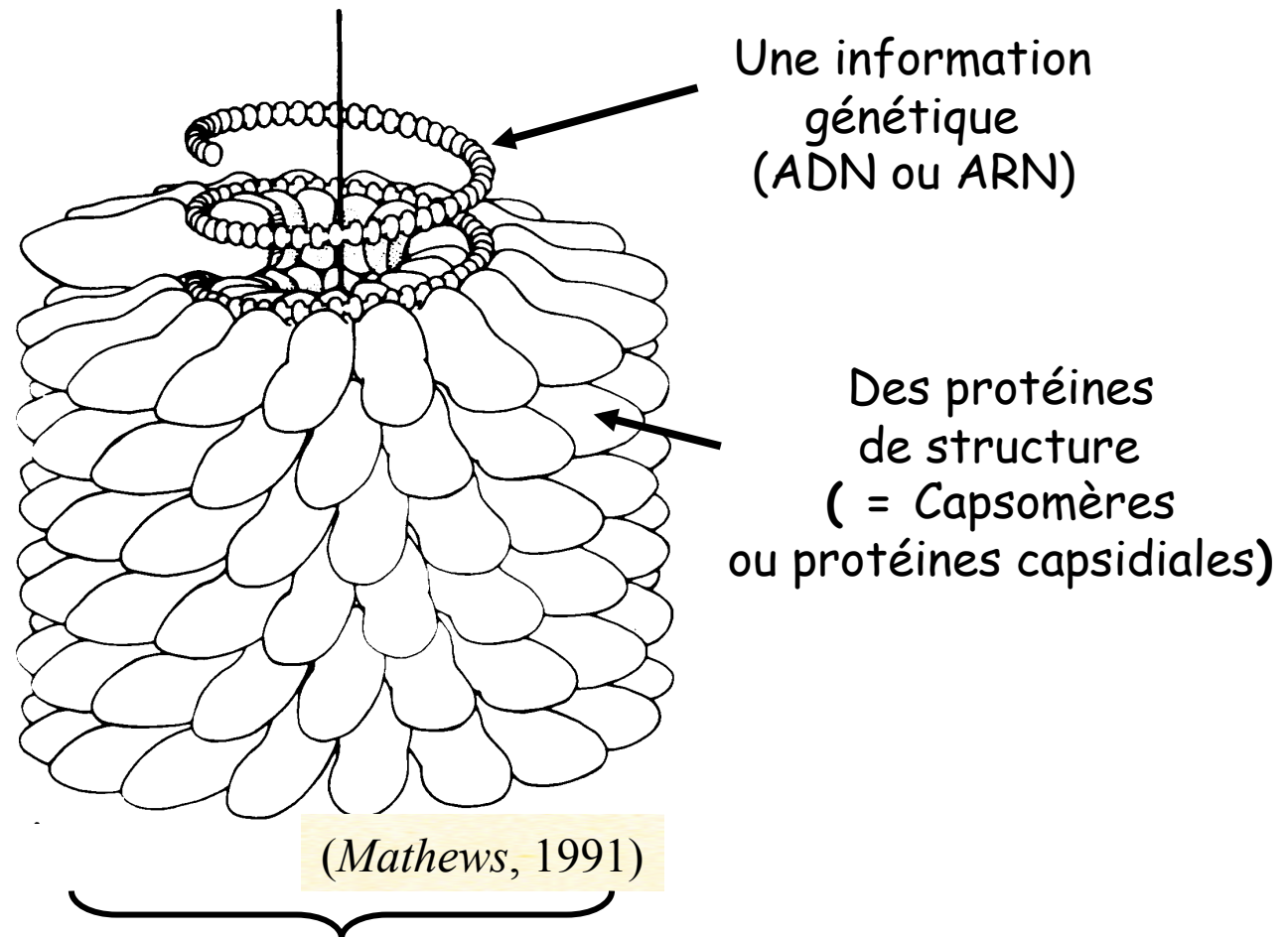
C 'est une entité infectieuse :

- Porteuse d 'une information génétique (ARN ou ADN ss ou ds)
- Dépourvue de la machinerie cellulaire capable de traduire l 'information génétique (cas particulier des *Giant viruses* ou *Mimivirus* des algues bleues et du phyto-, zoo-plancton)
- Produite par l'assemblage de composants préformés (n'a pas recours à la division)
- Effectue son cycle viral dans la cellule (localisation cellulaire, viral factory), s'y déplace (cytosquelette)
- Mouvement de cellule à cellule et à longue distance – différentes stratégies
- Transmission vers un autre hôte (mécanique, vecteurs, pollen, pratiques culturales...)

Les virus et viroïdes

	Agent	Nature	Information génétique	Fonction messagère	Synthèse protéique
Agents moléculaires	viroïde	dsRNA	-	-	-
	virus	nucléoprotéine	+	+	-
Agents cellulaires	phytoplasmes	ADN	+	+	+
	bactéries	ADN	+	+	+
	champignons	ADN	+	+	+
	phanérogames	ADN	+	+	+

De quoi est composé un virus ?



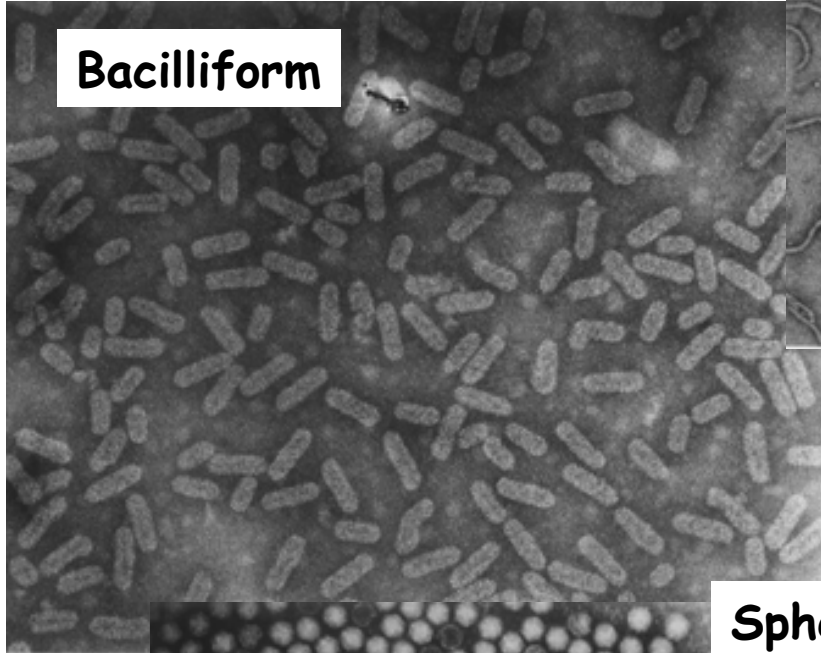
L 'ensemble constitue le virion ou la particule virale - études cristallographiques et ultrastructurales sub-nanométriques

Formes et structures

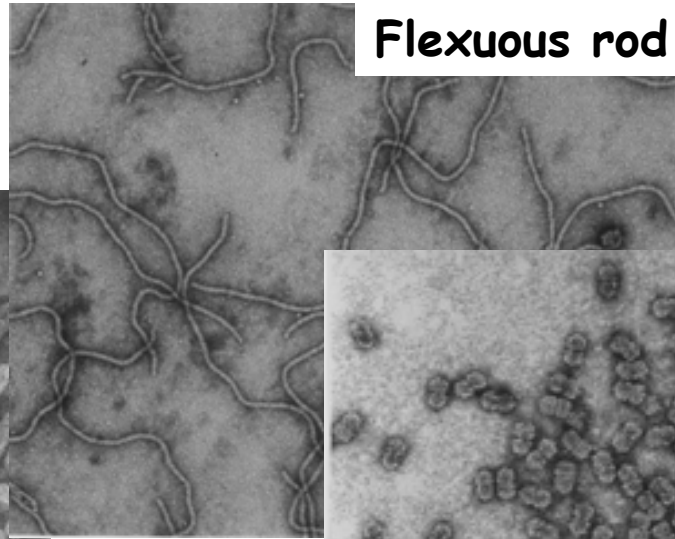
- La classification et la taxonomie des virus sont notamment basées sur :
 - les **dimensions** et la **morphologie** des virions
 - des particules **isométriques** ou globuleuses
 - des **bâtonnets rigides** ou des **formes filamenteuses**
 - des particules **bacilliformes**
 - des particules « **gémées** »

Structure des particules virales

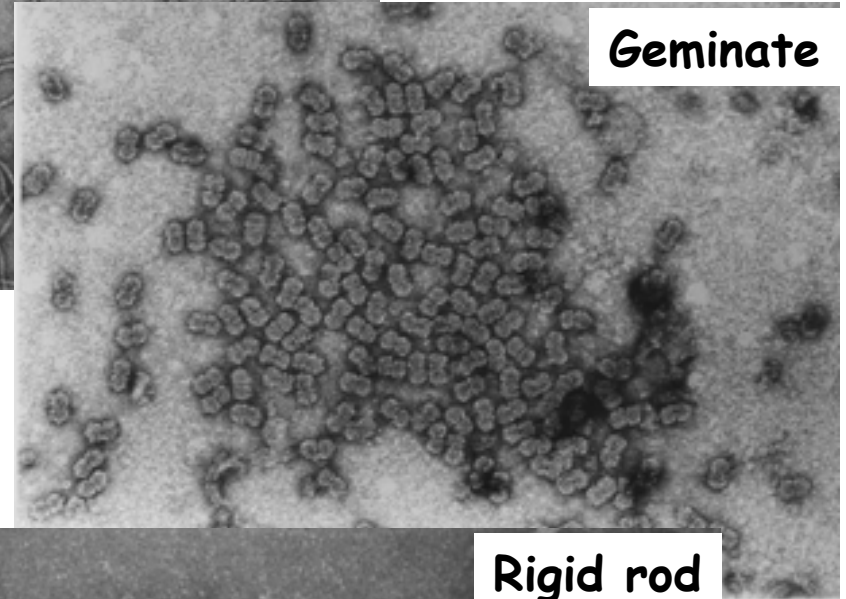
Bacilliform



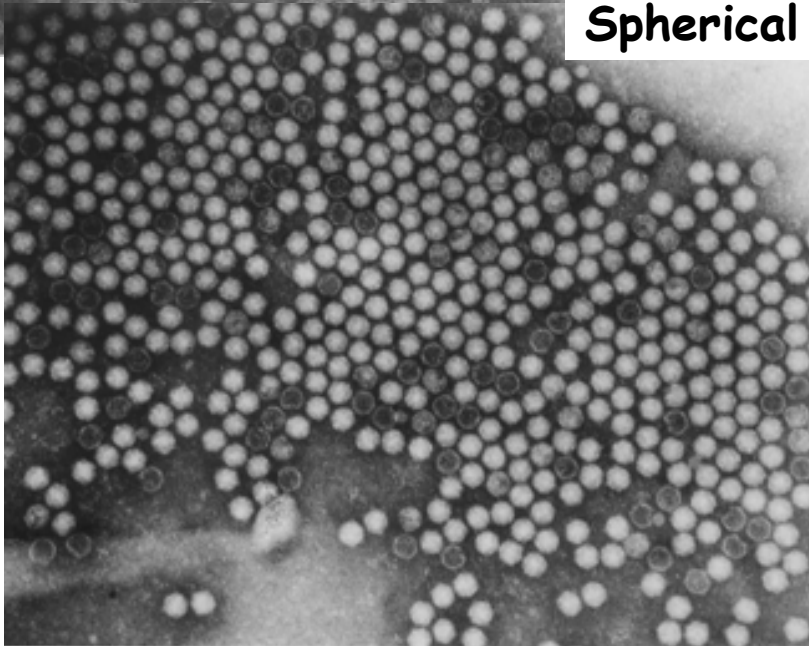
Flexuous rod



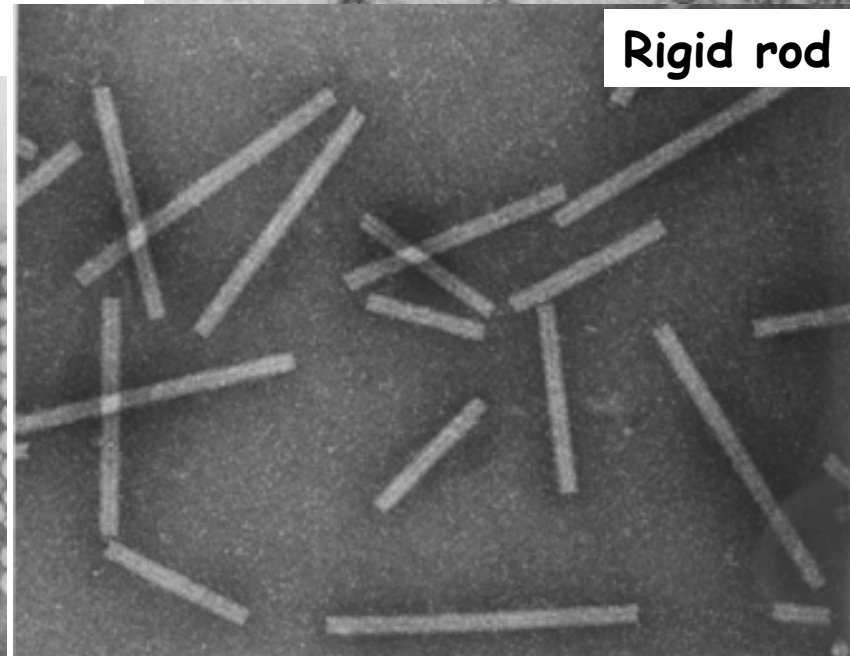
Geminate



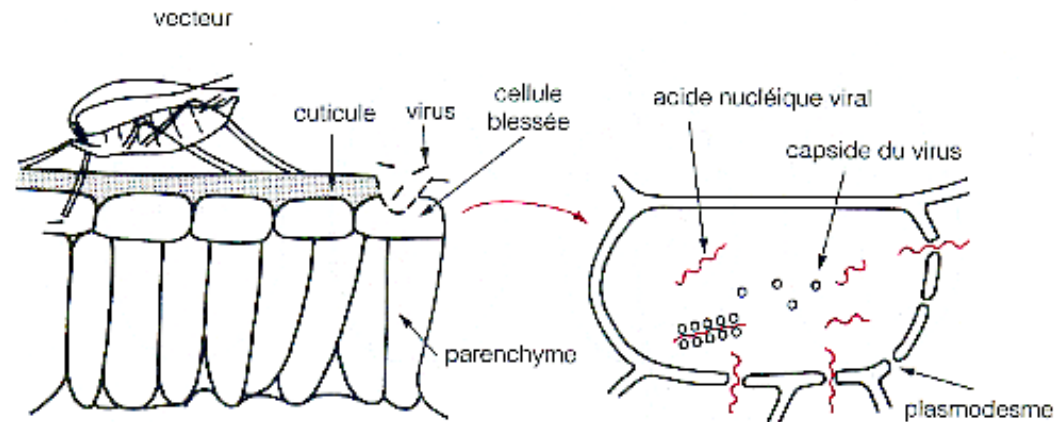
Spherical



Rigid rod

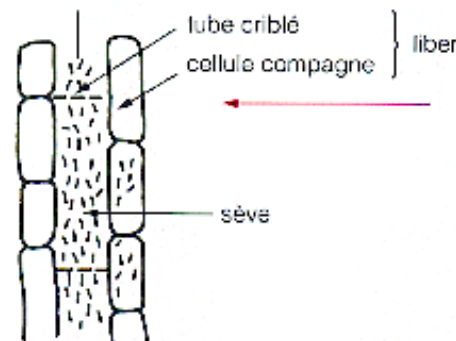


Le développement d'une infection virale

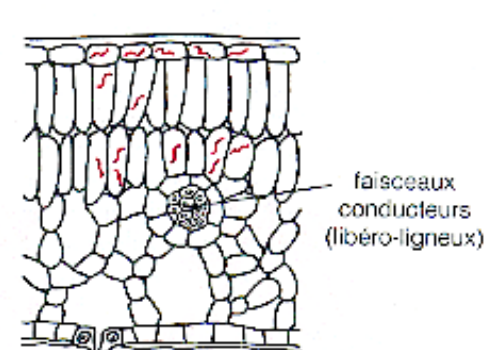


① Pénétration des particules virales dans une cellule épidermique (vecteur, blessure) de la feuille.

② Réplication de l'acide nucléique et formation de particules virales. Mouvement vers les autres cellules par la voie des plasmodesmes.



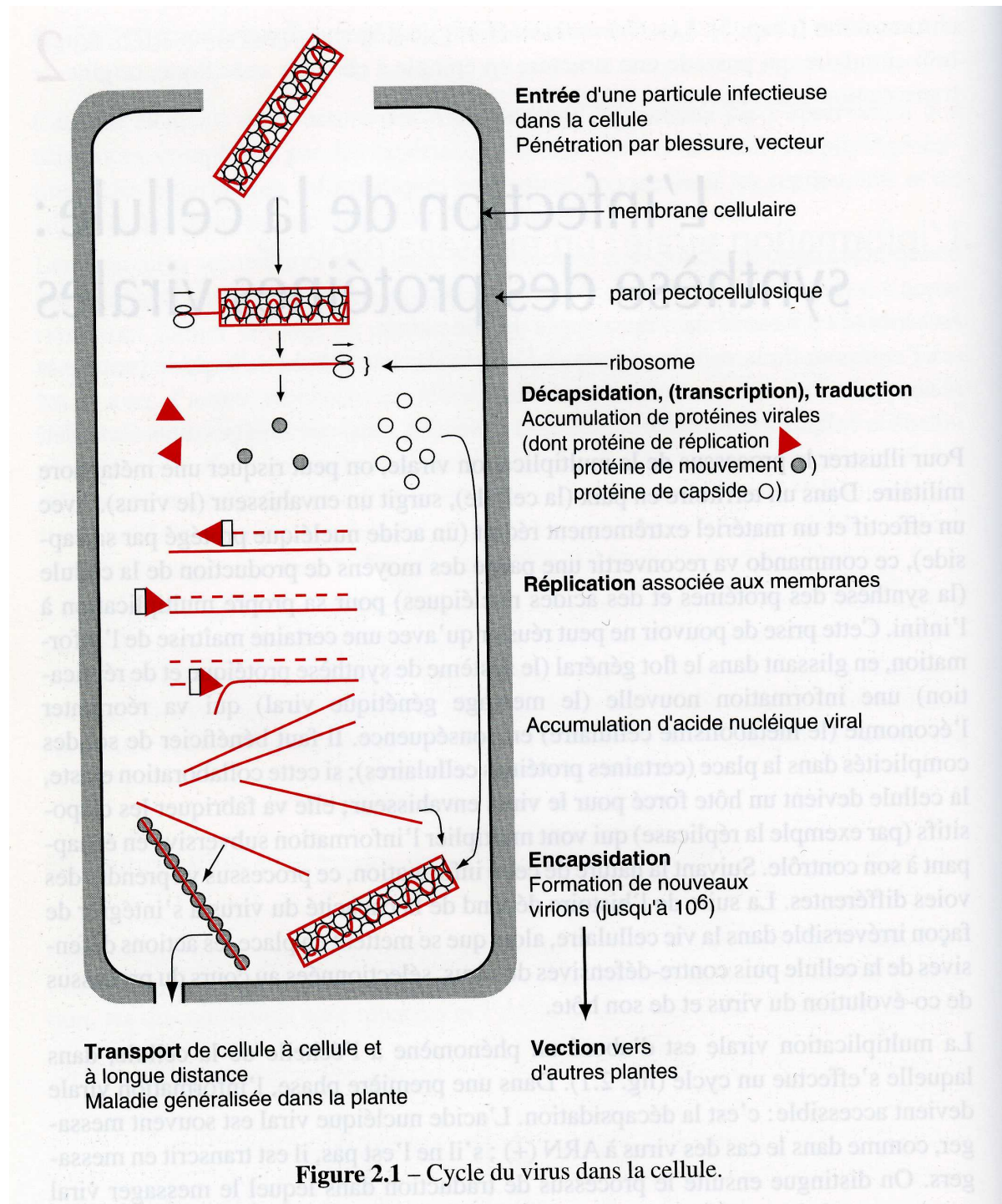
④ Migration à longue distance par la voie du phloème.



③ Infection des cellules parenchymateuses adjacentes jusqu'aux faisceaux conducteurs.

Figure 1.6. Développement de l'infection virale au niveau tissulaire.

Induction de la virose : quelques étapes clés du cycle viral (cf stratégies de réplication et d'expression)

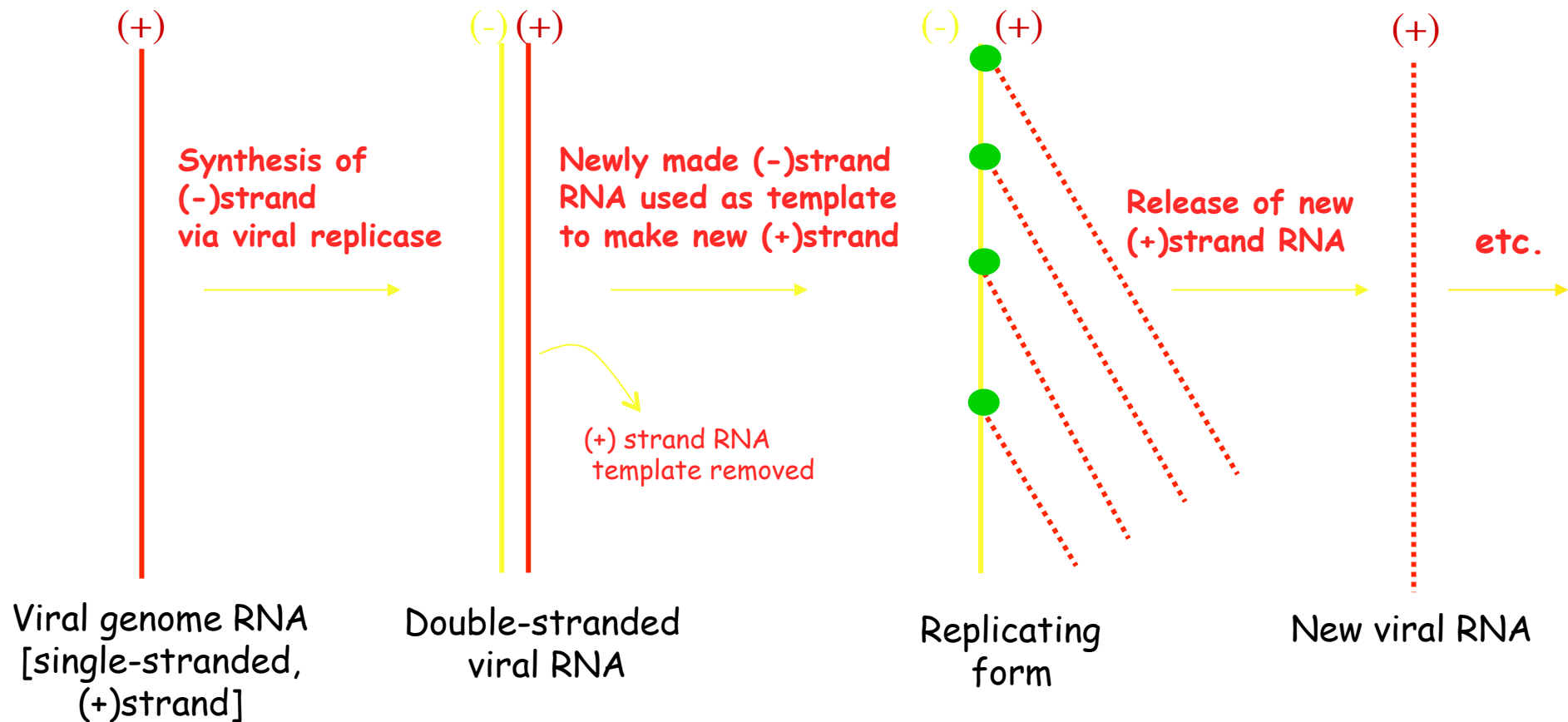


Les deux fonctions de l'ARN viral :

Fonction de modèle : assurer la synthèse de nouvelles molécules d'acides nucléiques (=fonction de transcription) ; IR et formes répliquatives

Fonction messagère : s'associer aux ribosomes pour exprimer l'information génétique (=fonction de traduction) ; viral protein linked to the viral genome (Vpg)

Réplication d'un virus à ARN - intermédiaire de réplication - **activation du PTGS**



- replicase = viral encoded RNA dependent RNA polymerase and helicase plus host proteins

Quelques viroses d'importance économique

Grapevine fanleaf virus - maladie du court-noué de la vigne
(transmis par nématode) ; 1 milliards € annuel pour la France



Sharka (*Plum pox potyvirus*) (transmis par puceron)
sur prunier, pêcher et abricotier



Tristeza (*Citrus tristeza closterovirus*) transmis par puceron sur citrus
(citronnier, oranger...)



Potato leafroll polerovirus (transmis par puceron) sur pomme de terre

Cucumber mosaic virus (transmis par puceron) sur piment, tomate et
concombre



Tomato spotted wilt tospovirus sur tomate
transmis par thrips



Pepino mosaic virus sur tomate
Transmission mécanique



La vigne et les virus

- La vigne est un réservoir à virus
 - 60 espèces virales (<http://www.icvg.ch/>) y ont été identifiés - 20 genres différents
- Caractérisés par des pathogénicités variables et des infections multiples
- Les *virus des genres Nepovirus* et *Closterovirus /Ampelovirus* occasionnent les maladies les plus dommageables à la vigne

Virus et maladies virales : 60 virus (espèces virales ICVG 2009), 20 genres différents

Nepovirus		
Grapevine fanleaf virus (GFLV)	Court-noué (30% du vignoble touché en 2004)	
Arabis mosaic virus (ArMV)		+++++
Tomato black ring virus (TBRV)		
Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)		
Strawberry latent ringspot virus (SLRV)		
Raspberry ringspot virus (RpRSV)		
Tomato ringspot virus (TmRSV)		
Tobacco ringspot virus (ToRSV)		
Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)		
Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)		
Artichoke Italian latent virus (AILV)		
Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)		
Peach rosette mosaic virus (PRMV)...		
Closteroviridae		
Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1)	Enroulements / incompatibilité de greffage	++++
Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2)		
Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3)		
Grapevine leafroll associated virus 4 (GLRaV-4)		
Grapevine leafroll associated virus 5 (GLRaV-5)		
Grapevine leafroll associated virus 6 (GLRaV-6)		
Grapevine leafroll associated virus 7 (GLRaV-7)		
Grapevine leafroll associated virus 8 (GLRaV-8)		
Grapevine leafroll associated virus 9 (GLRaV-9)		
Vitivirus		
Grapevine virus A (GVA)	Cannelure sur Kober	
Grapevine virus B (GVB)	Ecorce liégeuse	++
Grapevine virus C (GVC)		
Grapevine virus D (GVD)		
Grapevine virus E (GVE)		
Foveavirus		
Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV)	Cannelure sur Rupestris/dépérissement, Nécroses des nervures ?	
Marafivirus/Maculavirus		
Grapevine fleck virus (GFkV)	Marbrure	+
Grapevine asteroid mosaic-associated (GAMaV)		
Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV)		
Grapevine redglobe virus (GRGV)		+
Grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1)		
Autres virus		
Grapevine ajinashika virus (GAV)		
Grapevine berry internal necrosis virus (GBINV)		
Grapevine Algerian latent virus (GALV)		
Grapevine line pattern virus (GLPV)		
Grapevine angular mosaic virus (GAMV)		+/ -
Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)		
...		

Grapevine leafroll associated virus

Nom abrégé: GLRaV-1, GLRaV-2... à GLRaV-9 - sauf LR8

Famille: *Closteroviridae*

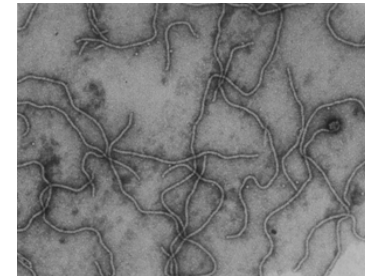
Genre: *Ampelovirus* ou *Closterovirus*

Maladie associée: l'enroulement

Symptômes principaux:

- Épaississement et enroulement du limbe
- Coloration ou décoloration du limbe

~ 1200-2200nm



Cépage noir



Cépage blanc

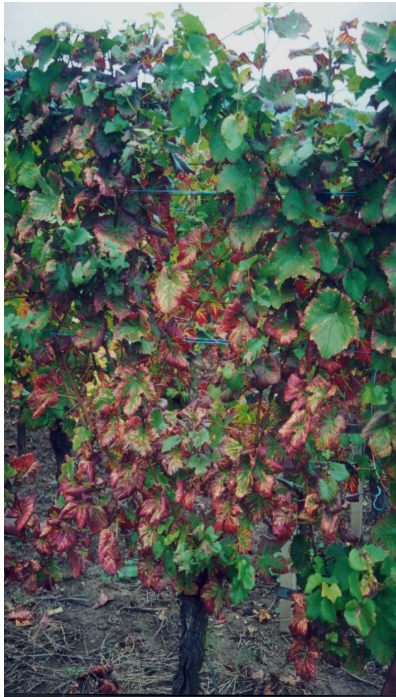
L'enroulement viral est répandu dans l'ensemble du vignoble mondial ; pour certaines combinaisons virus/cépage, pertes de rendement conséquentes (> 50%)

- En France, maladie en expansion ; les GLRaV1, 2 et 3 présentent la plus grande prévalence, le GLRaV2 étant probablement sous estimé
- Les infections multiples et les associations avec d'autres virus tels que népovirus et vitivirus ont des effets de diminution de vigueur sur les porte-greffes et peuvent générer des incompatibilités de greffage
- la dissémination verticale (anthropique) s'effectue par le matériel végétal virosé (matériel de multiplication, porte-greffe et greffon)
- la transmission horizontale est assurée par des insectes vecteurs (coccides et pseudococcides) pour LR1 et 3. Pas de vecteur identifié pour le LR2
- La lutte chimique (insecticide) est d'efficacité limitée avec un impact environnemental important
- Les mesures prophylactiques passent par la mise en œuvre de la sélection sanitaire et la certification, qui nécessitent l'utilisation des méthodologies de détection fiables, sensibles et polyvalentes
- Pas de gènes de résistance dominants identifiés, à l'exception de résistance partielle décrite chez certains Vitis américains
- La résistance dérivée du pathogène, par l'exploitation du gene silencing semble être une stratégie de contrôle prometteuse, associée potentiellement à de la lutte biologique vis-à-vis des vecteurs

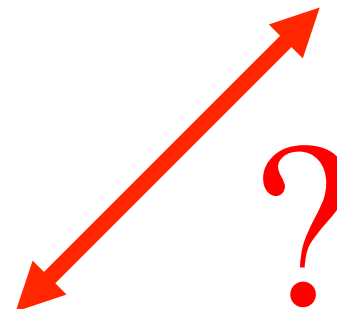
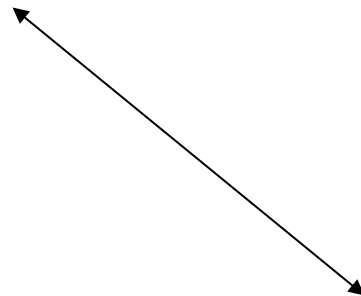
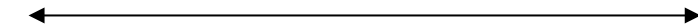


Enroulement viral de la vigne

Vigne



Ampélovirus GLRaV



Cochenille vectrice :
Parthenolecanium corni

Coccid and Pseudococcid species vectoring LR1 and 3 in the French vineyard and other vitivirus

* *Coccidae* family,

Parthenolecanium corni transmitting

GLRaV-1

Pulvinaria vitis transmitting

GLRaV-3

* *Pseudococcidae* family, mealybugs

Heliococcus bohemicus transmitting

GLRaV-1 & -3

Phenacoccus aceris transmitting

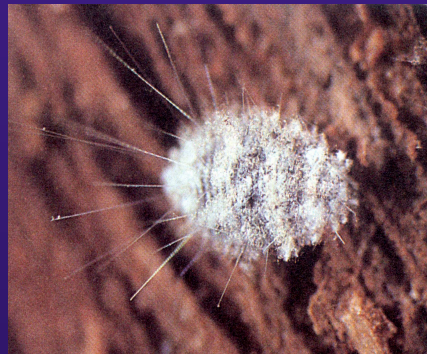
GLRaV-1 & -3

Planococcus ficus and *citri* transmitting

GLRaV-3, GVA and GVB



Phenacoccus aceris (L: 4 mm)



Heliococcus bohemicus (L: 3 mm)



Parthenolecanium corni (L: 5 mm)



Pulvinaria vitis (L: 10 mm)

Grapevine Fleck Virus

Nom abrégé: GFkV

Famille: *Tymoviridae*

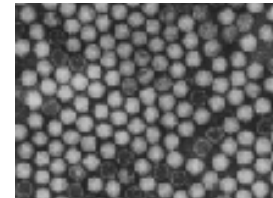
Genre: *Maculavirus*

Maladie associée: la marbrure

Symptômes principaux:

- Décoloration des nervures

~ 30nm



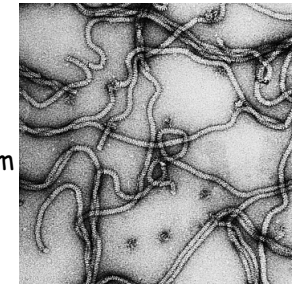
Grapevine virus A, B et Rupestris Stem Pitting associated Virus

Nom abrégé: GVA, GVB et RSPaV

Famille: *Betaflexiviridae*

Genre: *Vitivirus* ou *Foveavirus*

~ 800-1000nm



Maladies associées: complexe du bois strié
(Kober stem grooving, écorce liégeuse et Rupestris stem pitting)

Symptômes principaux:

- Sillons longitudinaux à la surface du bois
- Gonflement entre les nœuds



Kober stem grooving-GVA



Corky bark-GVB



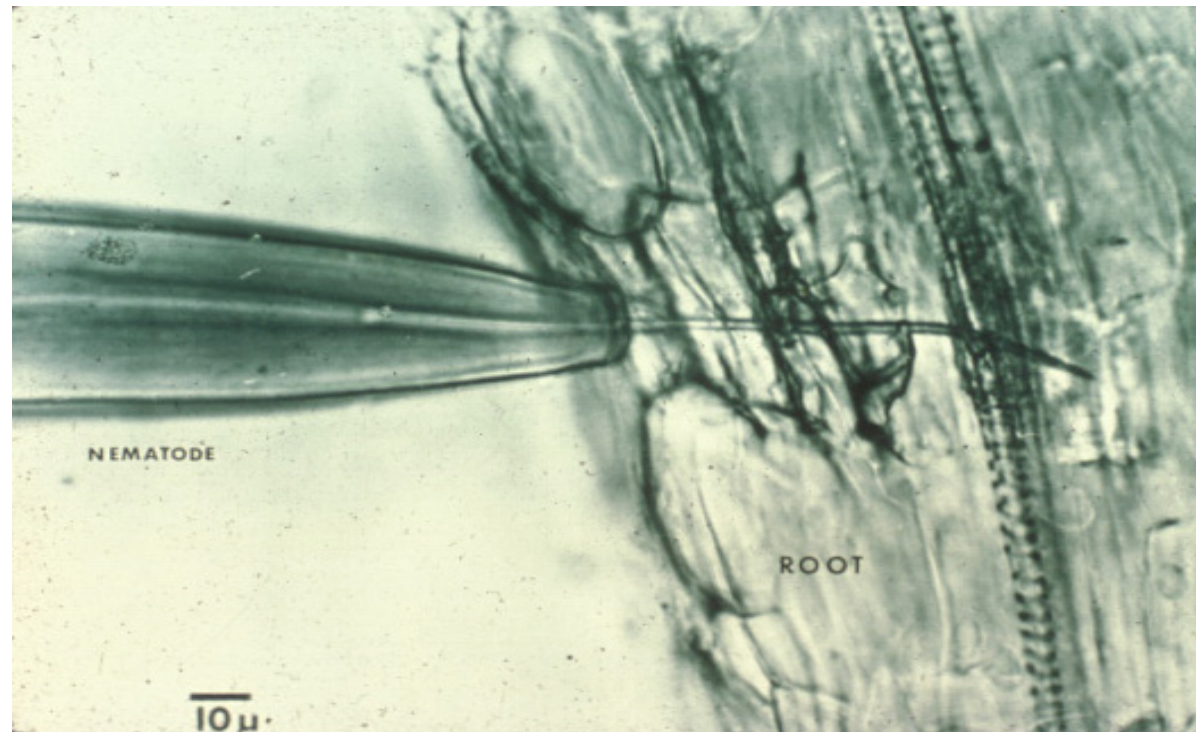
RSP-RSPaV

Foyers de court-noué en Bourgogne, sept 2009

- Entre 350 et 850 M€ de perte économique /an en France (IFV, com. personnelle 2010)
- 60% du vignoble national touché
- Impasse technique et réglementaire
- Alternatives à la lutte chimique et recherche d'itinéraires techniques

Acquisition et Transmission des 2 virus du court-noué par les vecteurs du sol (nématodes – *petits vers du sol*)

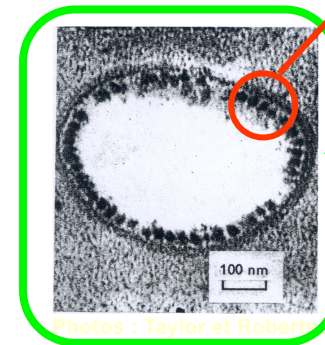
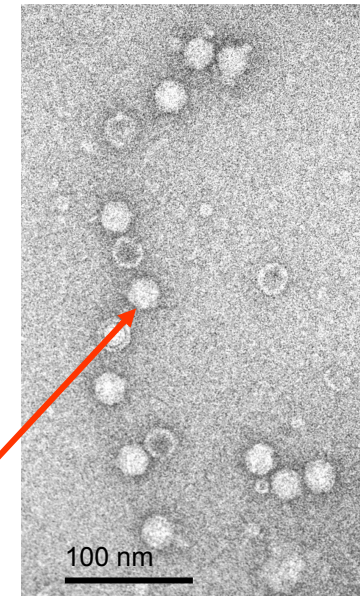
- *Xiphinema index*, vecteur du GFLV et *Xiphinema diversicaudatum* vecteur de l'ArMV (*Arabis mosaic virus*)
- Acquisition et transmission du virus par alimentation des nématodes vecteurs au niveau des systèmes racinaires de vignes ; les nématodes « suivent » les racines.



Les principaux agents du court-noué en France

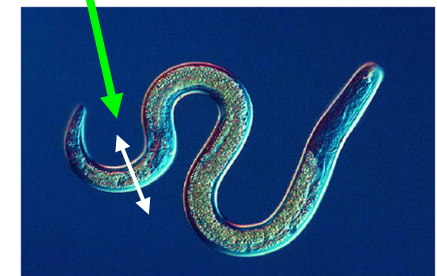
- *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*

- Virus du court-noué
- Incidence 90% en France
- Nématode vecteur ectoparasite : *Xiphinema index*

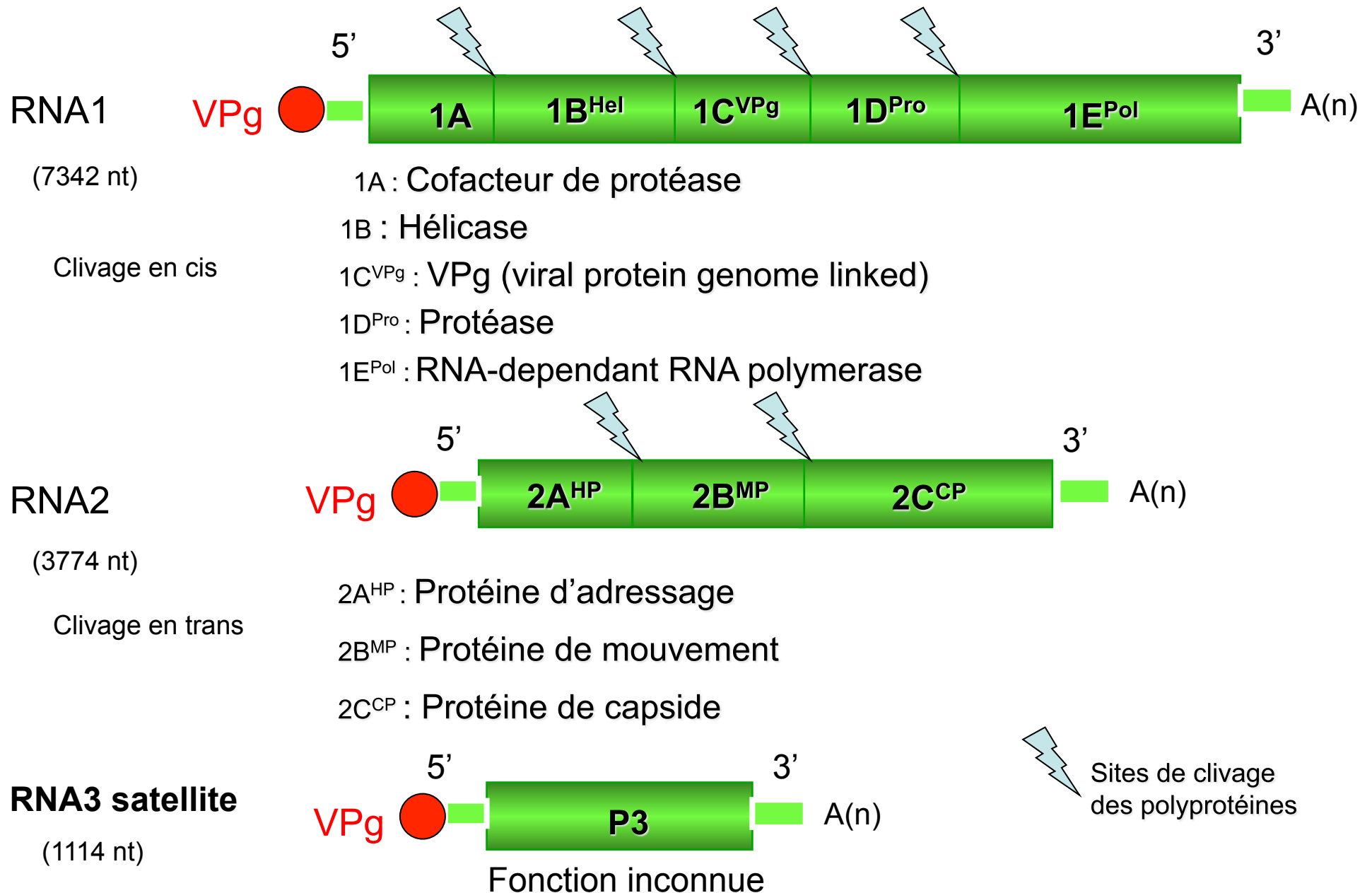


- *Arabis mosaic virus (ArMV)*

- Virus de la mosaïque de l'arabette
- Incidence 10% en France
- Nématode vecteur : *Xiphinema diversicaudatum*
- Possibilité de recombinaisons intra et inter spp



Organisation génomique du GFLV-F13





Prophylaxie et moyens de lutte actuels vis-à-vis du court-noué

- Certification
- Nématicides : tous interdits au 31/12/2009
- Jachère de 6 à 12 ans associée ou non à la dévitalisation, en fonction des parcelles (matériel initial, matériel de base, vignes mères de greffons et porte-greffe)
- Résistance variétale :
 - au virus : néant
 - au nématode : hybrides 3 voies à base de *Vitis rotundifolia*
- Prémunition avec variant à symptomatologie atténuée sur *C. quinoa* (GFLV-GHu) : résultats intéressants après 8 années d'expérimentation - mais impact négatif sur rendement et qualité des baies

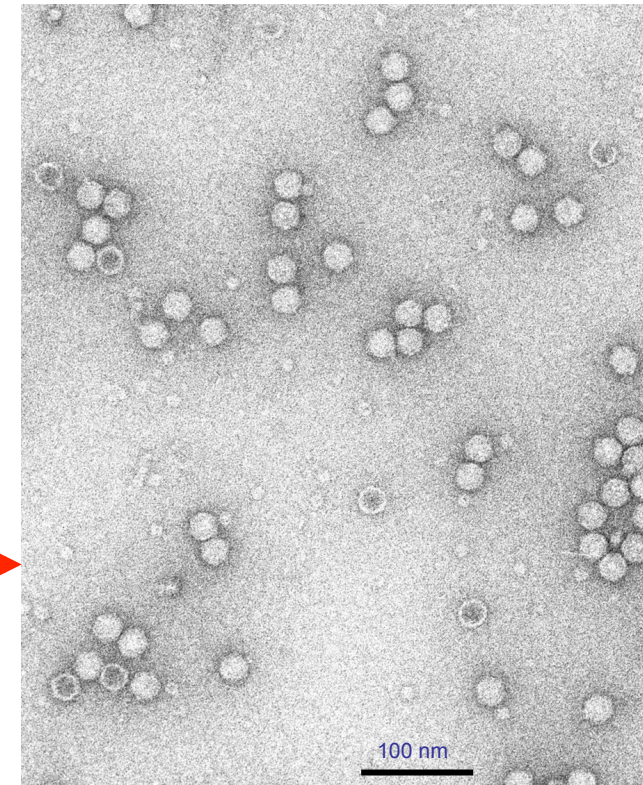
KOMAR, V., VIGNE, E., DEMANGEAT, G., LEMAIRE, O. & FUCHS, M. 2008. Cross-protection as control strategy against *Grapevine fanleaf virus* in naturally infected vineyards. *Plant Disease*, 92, 1689-1694.

Résistance dérivée du GFLV

La résistance basée sur l'ARN interférence est une alternative prometteuse



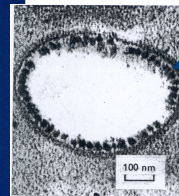
Vigne : vignoble alsacien,
cépage Sylvaner



Virus responsable
de la maladie : **GFLV**

Maladie du court-noué

SCELLENBERGER P., ANDRET-LINK P., KEICHINGER C., BERGDOLL M., MARMONIER A., VIGNE E., **LEMAIRE O.**, FUCHS M., DEMANGEAT G., RITZENTHALER C., **2010**. A stretch of 11 amino acids in the βB - βC loop of the coat protein of *Grapevine fanleaf virus* is essential for transmission by *Xiphinema index*. *Journal of Virology*, 84(16): 7924-7933 (doi:10.1128/JVI.00757-10)



LAIMER M., **LEMAIRE O.**, HERRBACH E., GOLDSCHMIDT V., MINAFRA A., BIANCO P. & WETZEL T. **2009**. Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in grapevine in Europe: a review. *Journal of Plant Pathology*, 91 (1), 7-23.

***Xiphinema index* :**

Nématode du sol, vecteur du GFLV selon le mode persistant



L'ARN interférence (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

Ce mécanisme antiviral est déclenché par de l'**ARN double-brin** (viral replicative intermediate dsRNA), et implique **RDR1** et **RDR6** (nouvelle génération de dsRNA), découpé par **Dicer DCL4 et 2** (RNase III) en petits ARNs interférents (**siRNAs**) de 21 à 24 nt

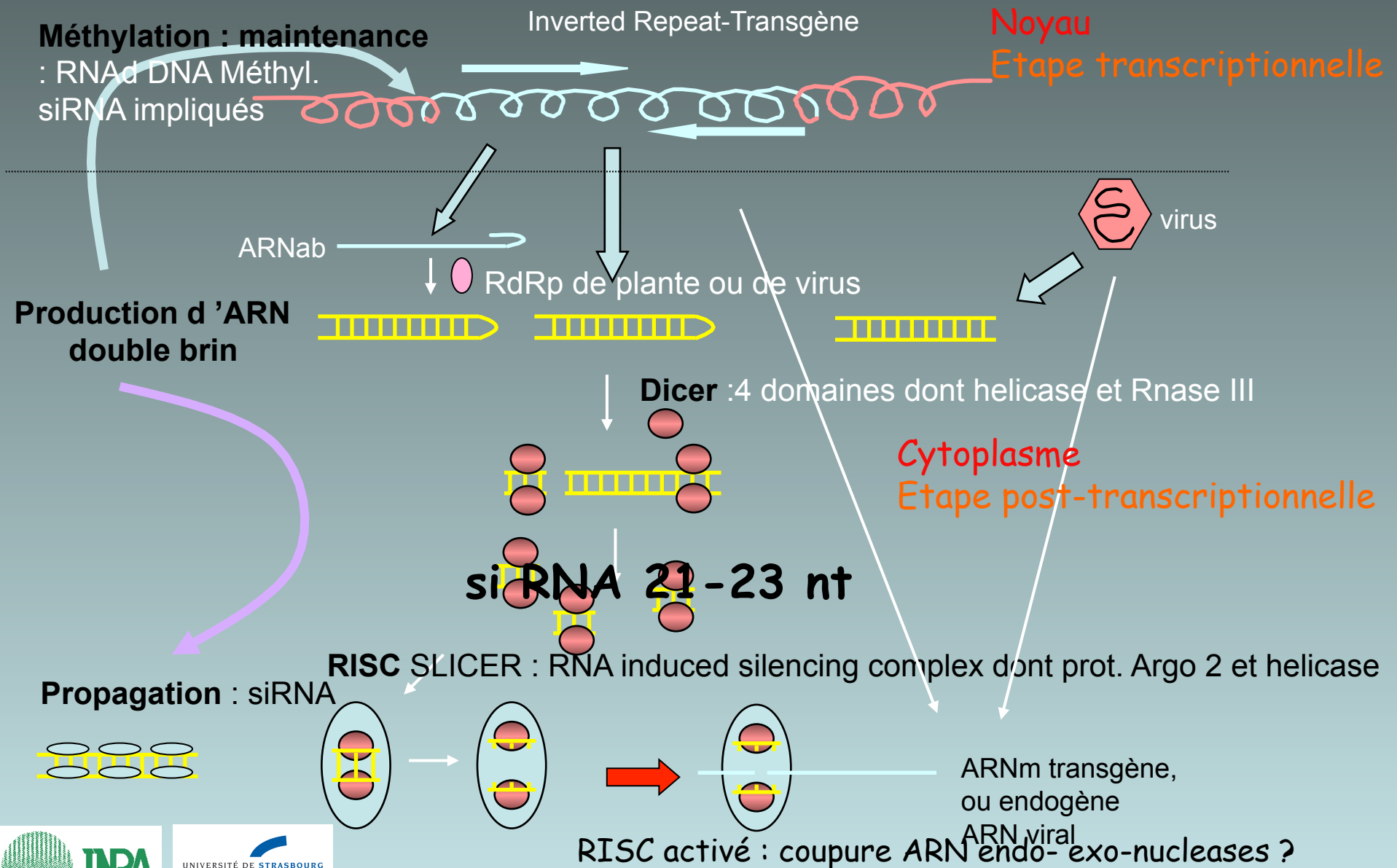
Les siRNAs sont incorporés dans un complexe multi-protéique dénommé **RISC** ou **Slicer** (activité endonucléase de **AGO** - RNase H-like), conduisant au **clivage de l'ARNm cible**, de façon séquence-spécifique.

Propagation du signal de cellule à cellule et à longue distance : **silencing systémique par les siRNAs**

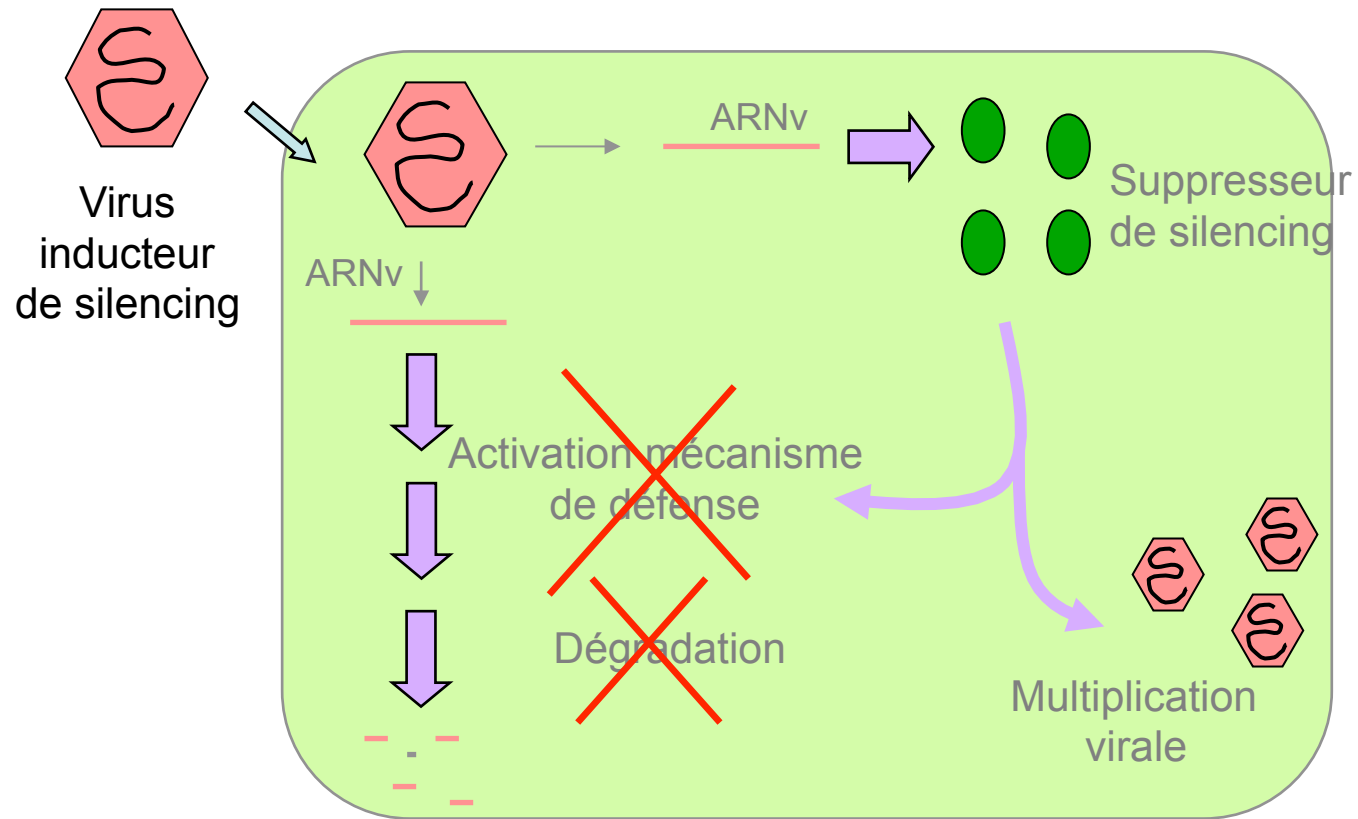
La plupart des virus ont élaboré des protéines dites « **suppresseurs de RNA silencing** » (Viral Suppressors of RNA Silencing - VSRs), pour contrer ce mécanisme à différents niveaux (P19, 2b, P0, HcPro, **P10**...)

« **Sensibilité** » du silencing aux **conditions environnementales** : les températures élevées (>25 °C) favorisent le silencing, alors qu'à basse température (<15°C) certaines voies du silencing sont inhibées

Modèle d'initiation et d'action du PTGS et du VIGS



Les supresseurs de silencing



Résistance dérivée du virus par transgénése
pour lutter contre la maladie du court-noué :

essai hors-confinement de porte-greffes
transgéniques de vigne

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

Vigne et al., Transgenic Research, 2004

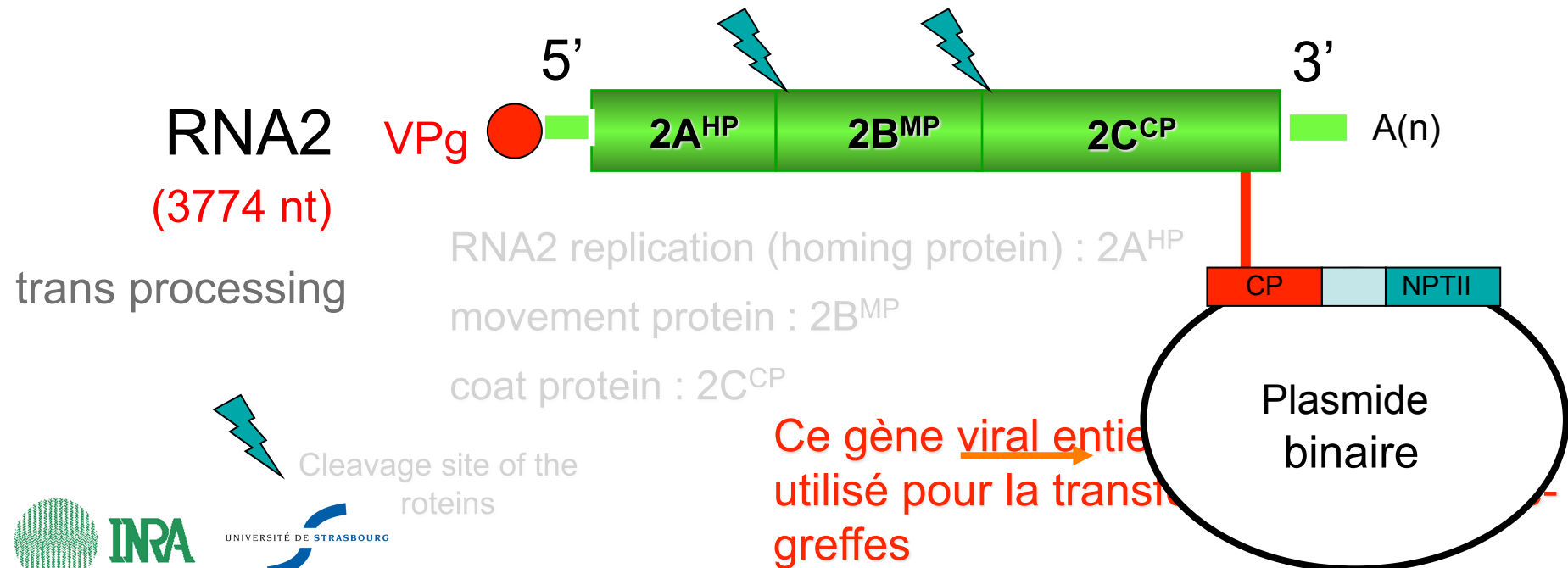
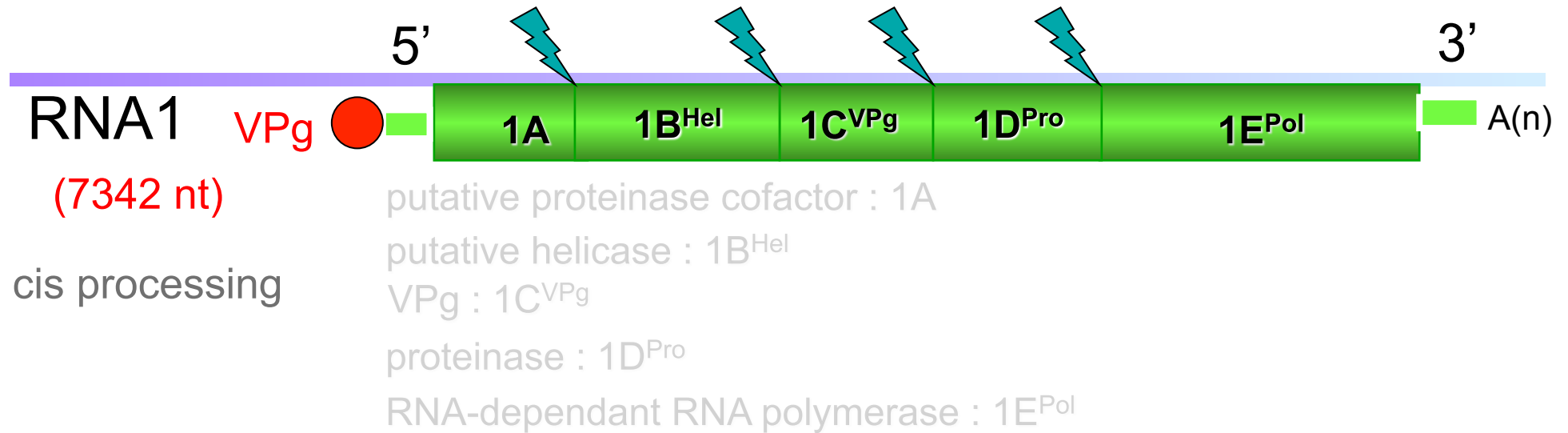
% Infection	Nb de lignées
0 %	3 (3 des 5 de la parcelle, qualifiées de « prometteuses »)
1 - 20 %	1
21 - 40 %	3
41 - 60 %	2
61 - 80 %	6
80 % contrôles non transgéniques	3
Total	18



Objectifs scientifiques de cette expérimentation unique
co-construite selon une démarche de recherche participative
avec un **Comité Local de Suivi - CLS** - (ANR POGM-008; ANR IMAGENE 2012-2015)

- 1- Confirmer nos données de 1999, sur le niveau de protection des porte-greffes (PG) transgéniques vis-à-vis de la maladie du court-noué en condition de plein champ
- 2- Mécanisme, mouvement des siRNA et durabilité de cette résistance basée sur l'ARN interférence chez le PG-OGM - Stratégie « CP » versus « hairpin »
- 3- Impact intra-plante sur l'assemblage PG-OGM/greffon non OGM : analyser le mouvement éventuel des produits des transgènes (CP et NPTII) du porte-greffe transgénique vers le greffon non-transgénique
- 4- Impact environnemental : évaluation du transgène viral protecteur sur les populations indigènes de GFLV (possibilité d'émergence de nouveaux variants viraux et de recombinants viables ?)
- 5- Impact environnemental : bactéries du sol au contact du transgène bactérien marqueur (gène NPTII) - HGT
- 6- Dynamique spatio-temporelle de la diffusion du foyer de court-noué : suivre la mobilité des nématodes vecteurs du GFLV, à l'extérieur de la zone inoculum initiale

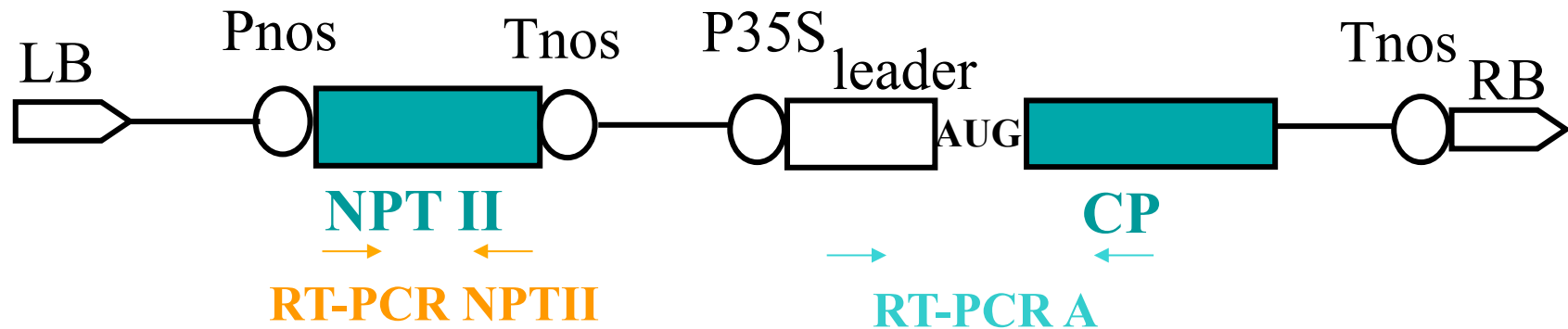
Organisation génomique du GFLV



SUITE : RT-PCR NPT-II

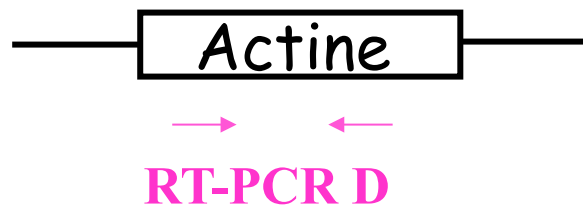
- RT-PCR NPT II

Détection spécifique de l'ARNm du transgène correspondant à une partie du gène conférant une résistance à la kanamycine

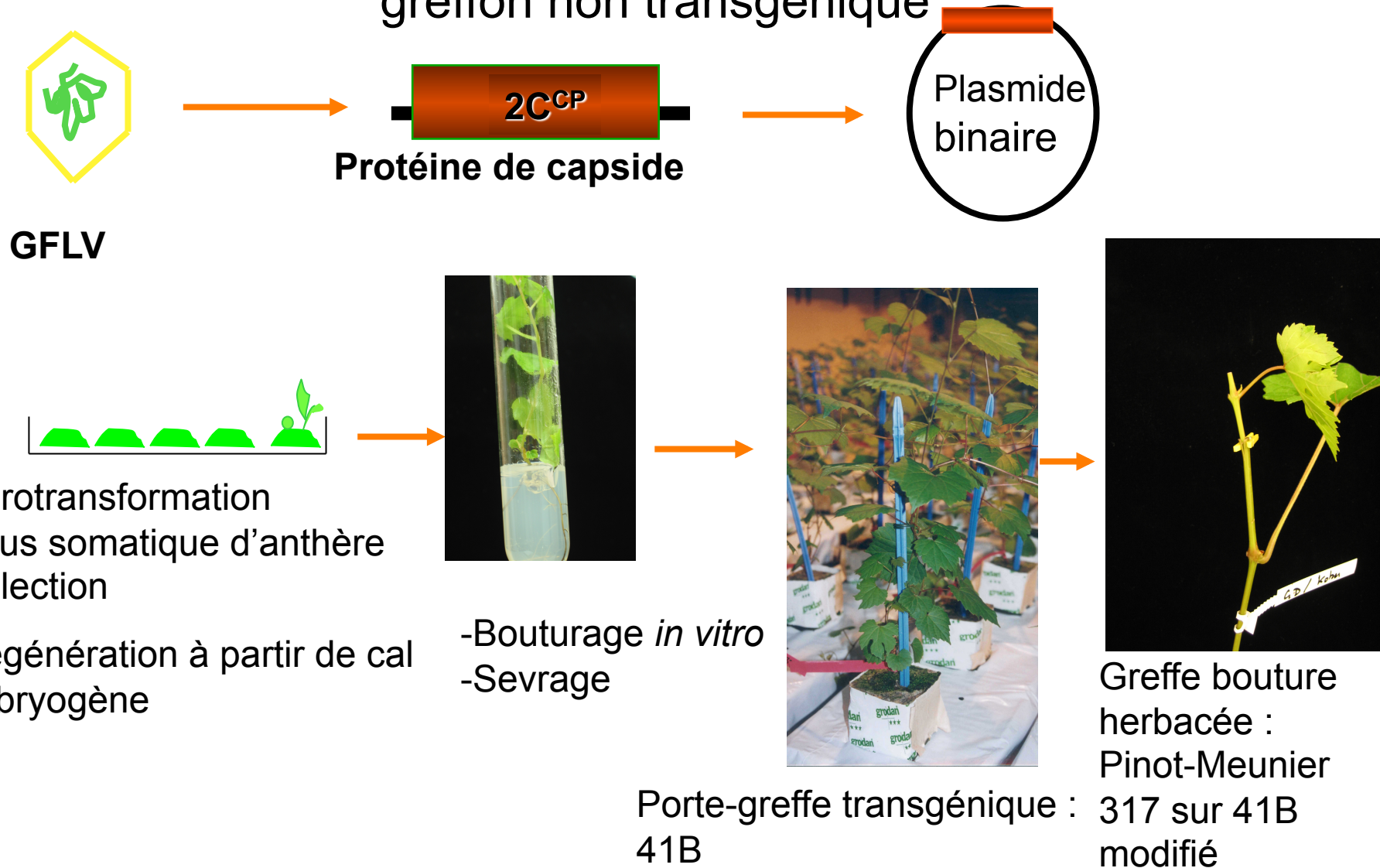


- RT-PCR D : contrôle positif de la manip

Détection d'une partie du gène codant pour l'actine



Résistance dérivée du pathogène pour lutter contre la maladie du court-noué de la vigne : les étapes de la transformation du porte-greffe et son assemblage avec le greffon non transgénique



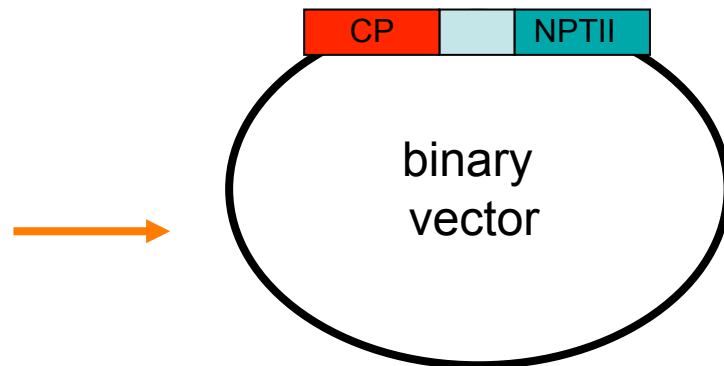
Rootstock-mediated resistance relying on the expression of the GFLV-F13 CP gene and expected RNA silencing

(Gambino, G. *et al.*, 2009, *Transgenic Research*)

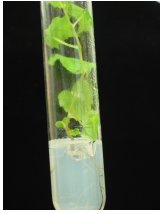
non-transgenic vitis scion, Pinot Meunier variety

graft junction

transgenic 41B hybrid rootstock



Translatable GFLV-CP gene used to engineer transgenic lines of rootstock 41B (Mauro, M.C. *et al.*, *Plant Science*, 1995). Neomycin PhosphoTransferase II -NPTII selection for agrotransformants screening



Evaluation de la résistance en présence de nématodes virulifères et en **condition de confinement** - phénotypage initial (3-4 ans) avant l'évaluation à l'extérieur
Avis du **Haut Conseil sur les Biotechnologies** et **signature** du Ministre (MAAP)

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



Mise en place du dispositif expérimental en plein champ

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

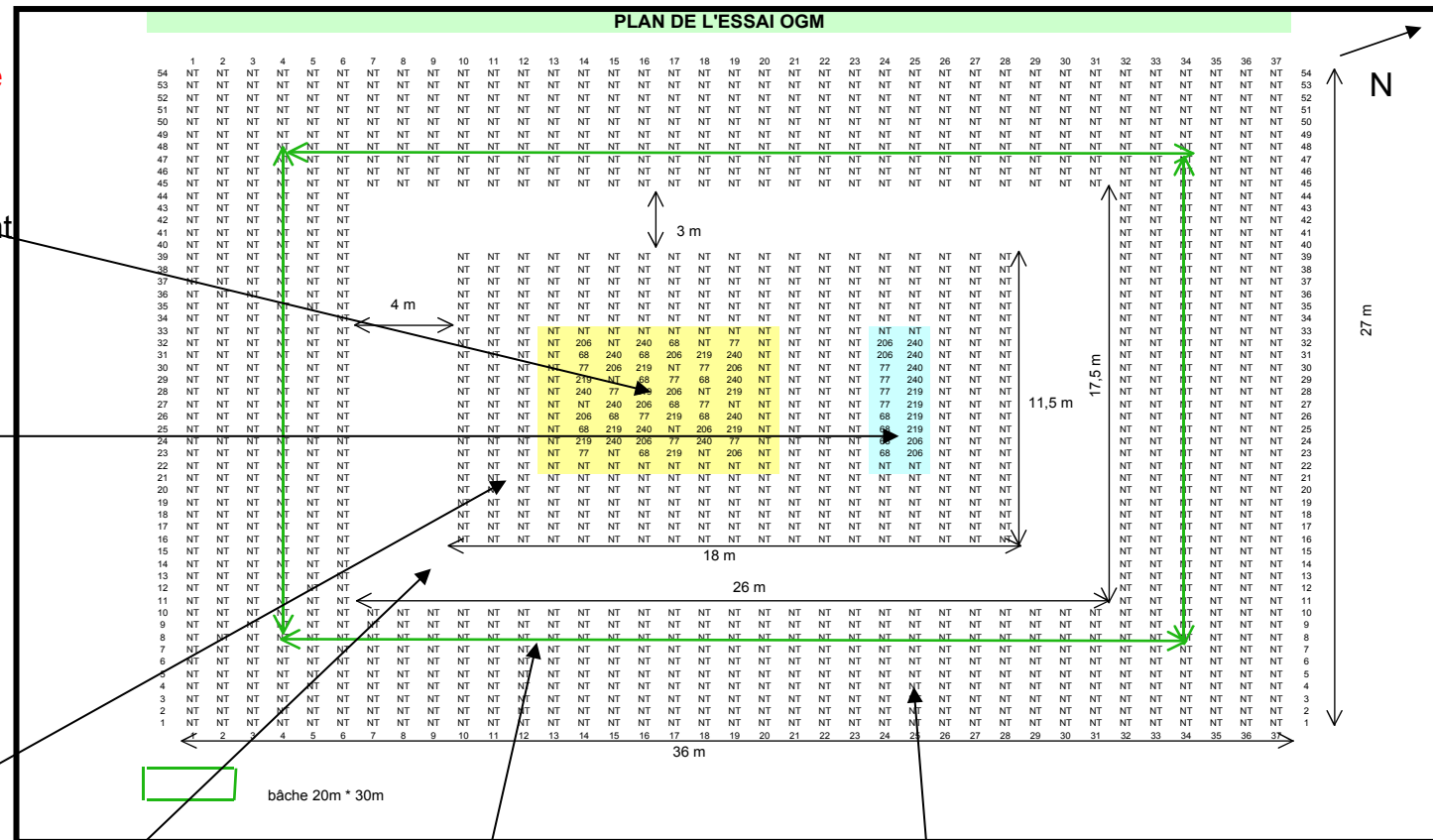
Zone de confinement :
430 plants 41B/PM317

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



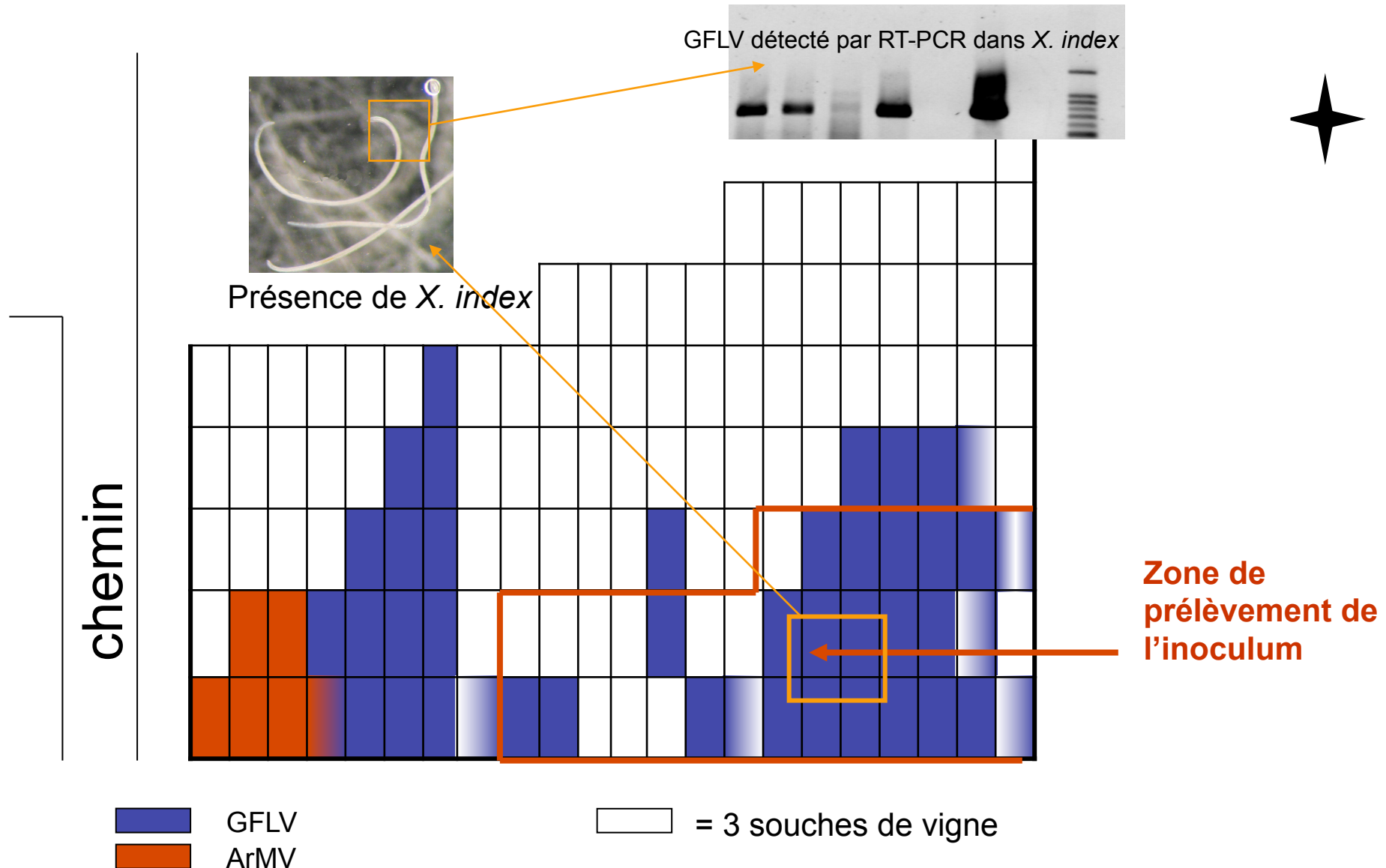




Analyse virologique de la parcelle donneuse

Premières analyses de sol : présence des vecteurs du virus (X. index) à raison de 10-15 individus/kg ; mise en évidence du GFLV par RT-PCR dans les nématodes :

Gérard Demangeat, Véronique Komar (oct 2005)



Inoculum prélevé au vignoble













Printemps 2008

Colmar open-field trial conditions 2005-2009 :

Interactive Technological Assessment approach (Joly, P.B. and Rip, A., *Nature*, 2007) and experimental conditions defined, following debates with a Local Monitoring Committee (LMC) (LMC, Lemaire, Moneyron et Masson, *Plos Biology*, nov 2010)



Open-field experiment in Champagne in the AOC vineyard (1996-1999) - Chardonnay/transgenic 41B : lower incidence of GFLV infection in 3 transgenic lines G 206, 219 and 240 out of 18 transgenic lines after a 3 years experiment (Vigne, E. et al., *Transgenic Research*, 2004)



Open-field experiment at INRA Colmar (2005-2009) ; Pinot-Meunier/ transgenic 41B - the five transgenic lines G 68, 77, 206, 219 and 240 are being evaluated

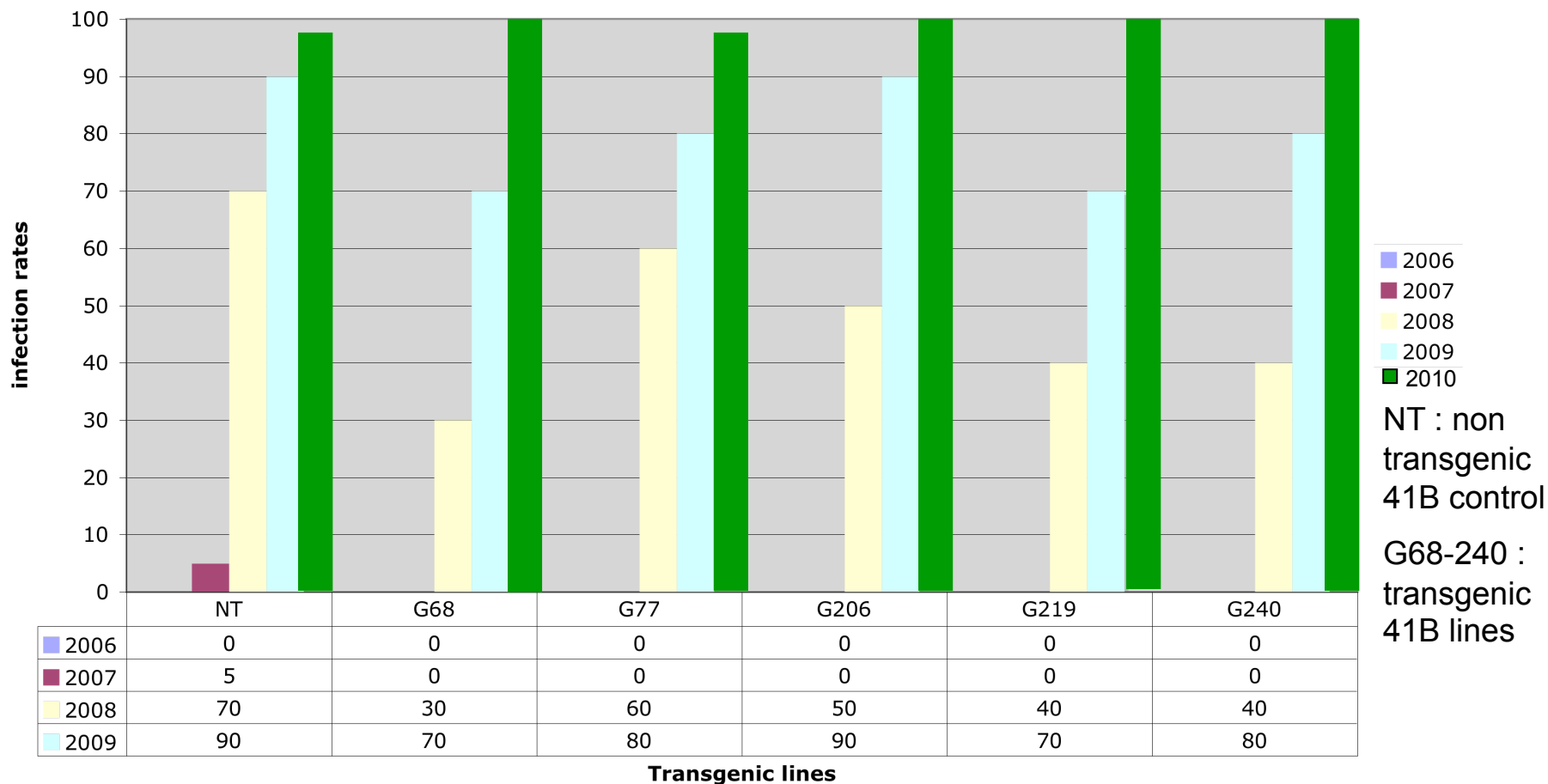
1- Confirmer nos données préliminaires sur le niveau de protection des porte-greffes transgéniques vis-à-vis de l'infection naturelle du GFLV *via* les nématodes vecteurs en condition de plein champ (*versus* milieu confiné)

Evaluation de la résistance



Les porte-greffes transgéniques ne permettent au mieux qu'un retard à l'infection de la plante entière, par le GFLV

Kinetic of ELISA-positive plants - 2006-2009



HEMMER C., VIGNE E., GOLDSCHMIDT V., KOMAR V., MARMONIER A., VALAT L., DEMANGEAT D., VIGNERON S., MASSON J. & LEMAIRE O. 2009. Transgenic rootstock expressing GFLV CP gene in a three years field trial; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchanges between rootstock and scion. 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Dijon, 31 August – 4 September 2009, *Le Progrès Agricole et Viticole*, 228-229.

Impact environnemental ?

Transgènes et virus : risque pour la santé et pour l'environnement

Risk assessment of virus-resistant transgenic plants (VRTPs), Tepfer M., Annual review of Phytopathology, 40, 467-491, 2002) ;

Gene flow from crops to crops and from crops to wild relatives - does it matter ecologically ? Johnson B. R., Aspects of applied Biology, 74, 53-65, 2005 :

risques potentiels, encapsidation hétérologue, effet sur la transmission, recombinaison...

- ☐ Toxicité de la protéine exprimée ?
- ☐ Dispersion des transgènes par le pollen dans l'environnement, dans la plante (greffe) ?
- ☐ Complémentation fonctionnelle ?
- ☐ Recombinaison du transgène avec un génome viral ?
- ☐ « Resistance breaking isolates », Durabilité ?
- ☐ Principe de précaution

Protéines de structures de virus végétaux non toxiques pour l'homme

« *RNA viruses found in the human gut* » (Plos Biology, 4, 1, 2006)

Plus de 100 10¹² microorganismes chez un homme, dont virus phytopathogènes à ARN qui conservent leur pouvoir infectieux

Ex : Piment et tomate transformés par la CP du CMV, aucune toxicité, génotoxicité, réaction allergique...chez rats et souris. (*Safety assessment for genetically modified sweet pepper and tomato*, Zhangliang et al., *Toxicology*, 2/3, 297-307, 2003).

Séquences non codantes, hairpin...

Résistance induisant l'extinction post-transcriptionnelle des ARN homologues à privilégier

Dispersion des transgènes viraux par le pollen

Peuvent être transférés d'espèces allogames transgéniques à des espèces sauvages compatibles

Nombreuses études dont celle réalisée aux USA entre courges transgéniques (CMV, ZYMV, WMV) et sauvages a montré le transfert du transgène viral (CP) ; pas d'avantage sélectif pour ces adventices (Fuchs *et al.*, Transgenic research, 8, 429-439, 1999) ; *Potex* et *Potyvirus CP* genes chez *Trifolium repens*, pas d'impact de ces transgènes sur les adventices de la famille des Fabacées (Godfree *et al.*, Australasian Journal of Botany, 52, 3, 321-331, 2004)

Ou d'autres qui montrent qu'il n'y a pas de transfert ou d'effet sur plantes environnantes : tomate transformée par le satellite du CMV (Iwasaki *et al.*, Research Bulletin NARC, 182, 51-63, 2005)

Rque : Dispersion des transgènes viraux par le pollen

Ce processus peut aussi se produire de façon courante avec les flux de gènes pour les résistances classiques :

a t-on déjà mis en évidence l'avantage sélectif conféré par ces transferts de pollen issu de plantes cultivées exprimant une résistance dominante ou récessive conventionnelle, chez des adventices ?

Plantes transgéniques, risques environnementaux

Complémentation fonctionnelle : encapsidation hétérologue
(une seule génération)

Hétéro-assistance à la transmission, mouvement dans la
plante...disparaît lorsque le virus n'est plus dans une plante
transgénique

Suppression des domaines impliqués au niveau du transgène

(séquences tronquées, impliquées dans la reconnaissance avec
le vecteur, DAG , « hot spot » de recombinaison par exemple)

Plantes transgéniques, risques environnementaux

Recombinaison avec populations sauvages de virus
(phénomène largement décrit dans les plantes
herbacées transgéniques ; « *RNA mediated
resistance* » peu ou pas concernée)

Modification des propriétés biologiques ?

Avantage sélectif ?

qq exemples : CCMV, CaMV (Tepfer)

Améliorer la conception des transgènes/ recombinaison

- Eliminer hot-spot ou séquences favorables à la recombinaison
- Tenir compte du rôle de la réplicase et éliminer les séquences 3' UTR des transgènes reconnues par la réplicase virale
- Choix de séquences courtes, tronquées, de type « hairpin »...

Impact environnemental dans l'interaction vigne OGM-GFLV

- Au niveau du virus :

Apparition de variants ?

Recombinaisons avec le transgène ? Conclusions sur les résultats de l'étude de Champagne pour les recombinaisons GFLV-GFLV. Quelques éléments sur les recombinaisons ArMV-GFLV

Suppresseurs de « silencing »

- Au niveau du nématode :

Spécificité vectrice modifiée ?

Diminution du potentiel infectieux ?

- Au niveau de la vigne :

Transfert de signaux PG – greffon ; un greffon sur un porte-greffe transgénique, peut-il être considéré comme non OGM ?

- Au niveau de l'écosystème :

Flux de gène via le pollen ? Impossible, PG mâle stérile

Via les bactéries du sol vis à vis de la résistance à la kanamycine ; transfert

NPTII ?

Etudes d'impact à réaliser



Mouvement des produits des transgènes ? Impacts environnementaux ?

Greffon non transgénique

Impact environnemental : populations de GFLV ?

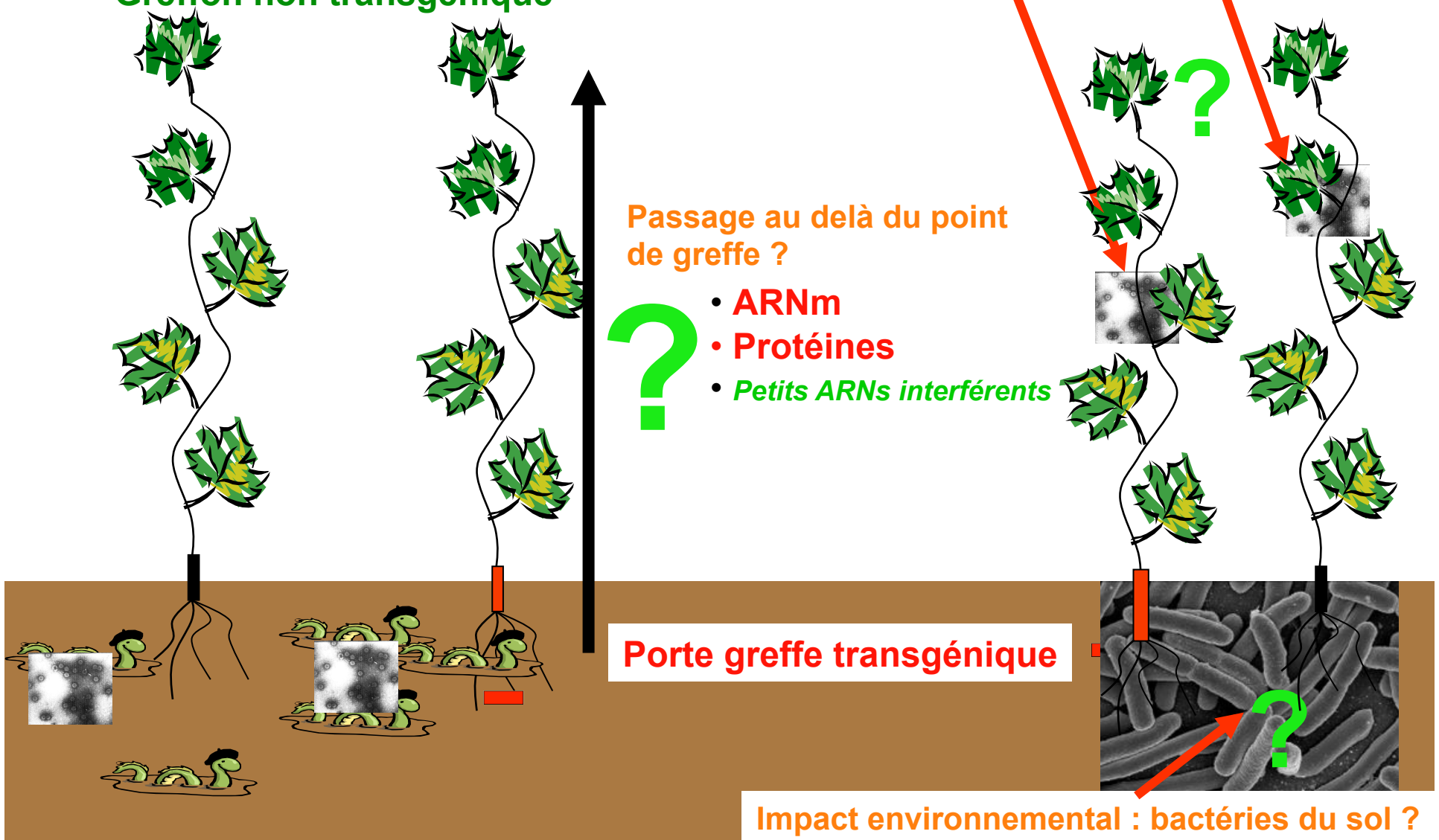
Passage au delà du point
de greffe ?



- ARNm
- Protéines
- *Petits ARNs interférents*

Porte greffe transgénique

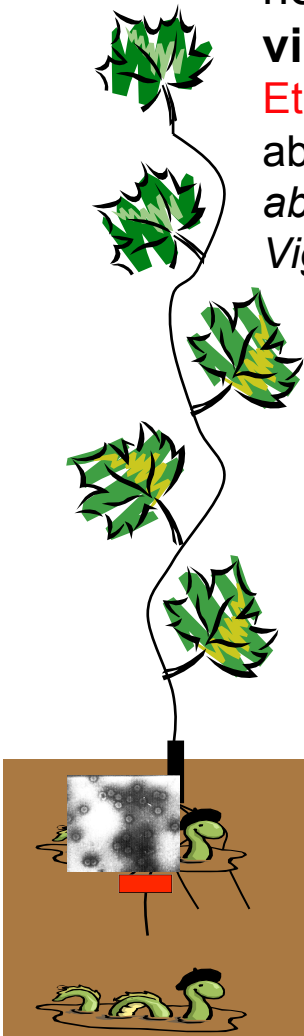
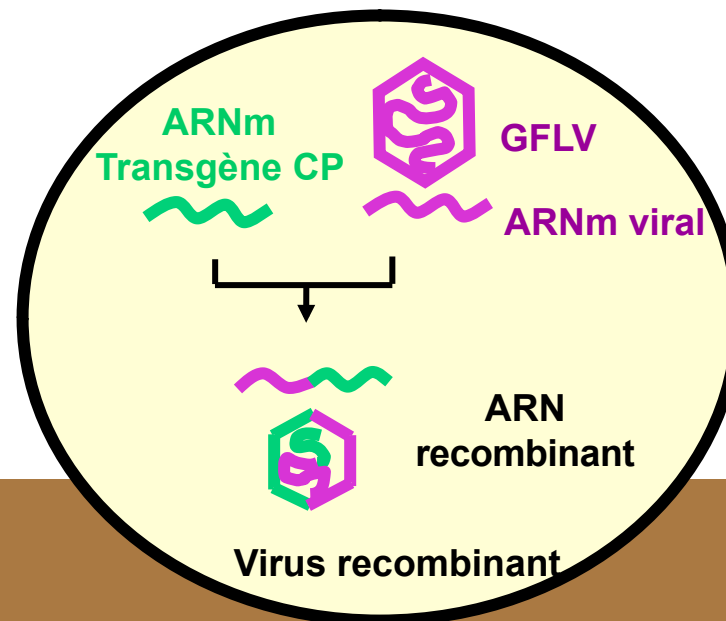
Impact environnemental : bactéries du sol ?



Variabilité virale et recombinaison

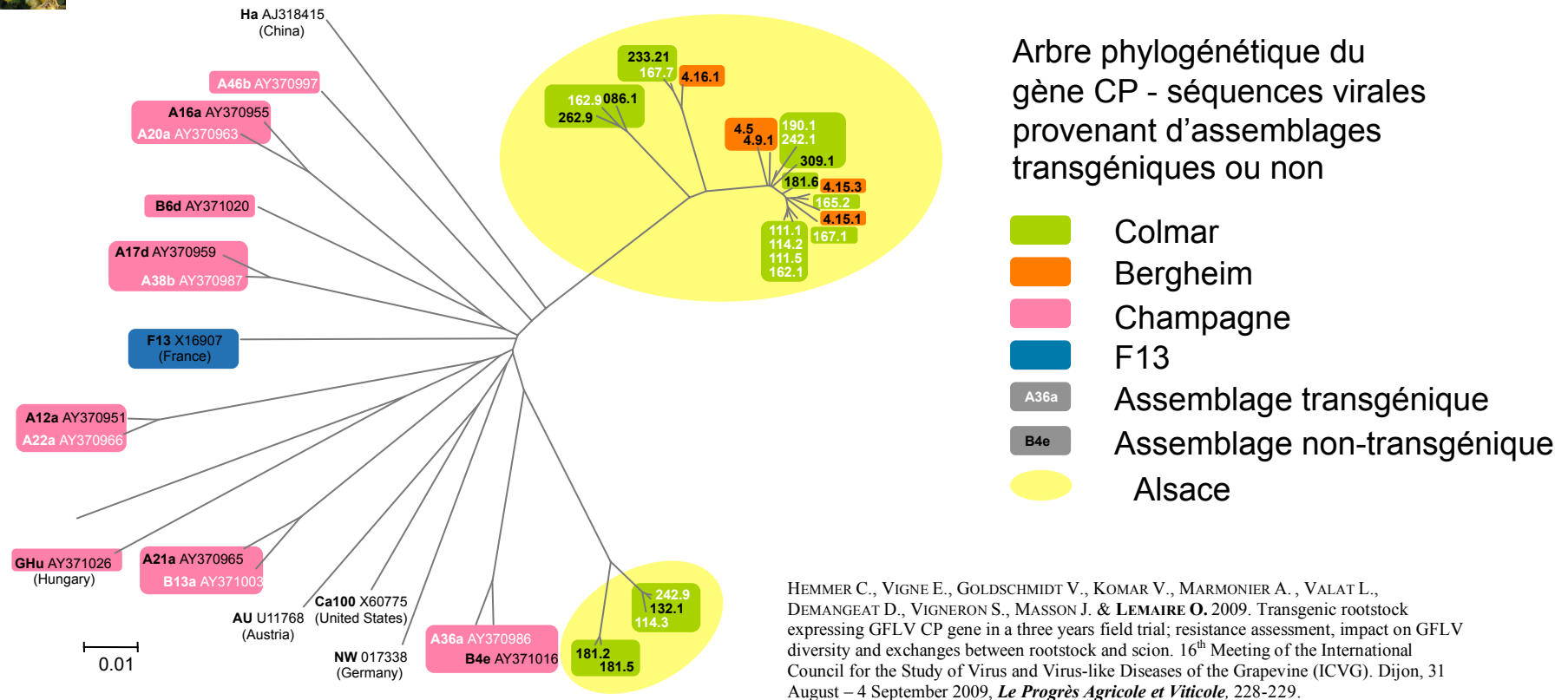
Evaluer l'effet des porte-greffes transgéniques sur la dynamique et la variabilité génétique des populations indigènes de GFLV transmises par les nématodes virulifères : **possibilité d'émergence de nouveaux variants viraux et événements de recombinaison ?**

Etude conséquente déjà réalisée par l'équipe (projet européen TransVir) :
absence de recombinants viables transgène-GFLV sauvage (Vigne et al., 2004a)
absence de recombinants intra- et inter-espèces népovirales (essai prémunition - Vigne et al., 2009)





Impact environnemental du transgène viral CP : modifications des populations virales indigènes de GFLV ?



- Les porte-greffes transgéniques **ne modifient pas la structure de la population virale au niveau du gène CP, ni la composition en variants moléculaires** ; et ailleurs au niveau du génome entier ? Projet d'étude par métagénomique
- La diversité génétique de la 2C^{CP} des isolats d'Alsace différente de celle de la 2C^{CP} de Champagne pourrait être une des explications de l'échec de cette stratégie CP sur les 3 lignées prometteuses : **analyses multilocales indispensables pour évaluer robustesse et durabilité de la résistance par ANR interférence**

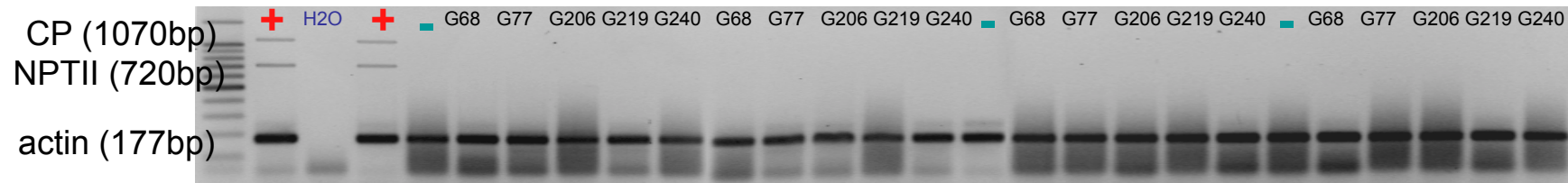
2- Analyser le transfert éventuel des produits du transgène CP et NPTII (protéines, mRNAs, siRNAs) du porte-greffe transgénique vers le greffon non-transgénique

Translocation des produits d'expression des transgènes : matériel extérieur et en confinement

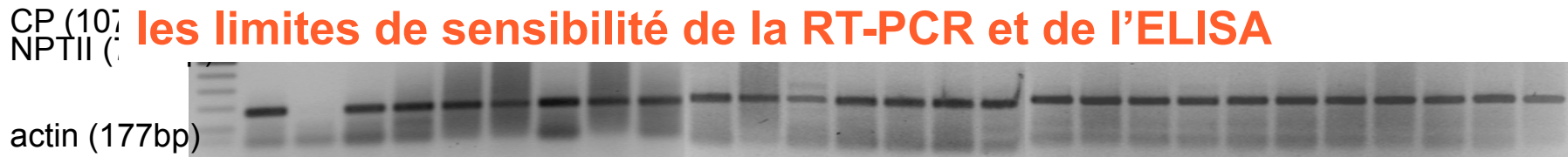


Mouvement des produits des transgènes ?

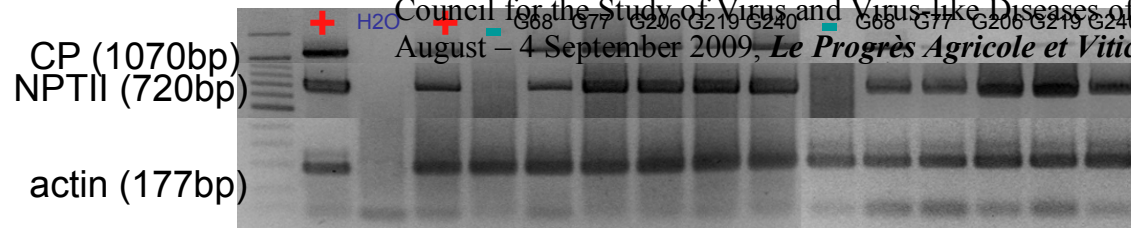
Flowers of the scion



Les ARNm et protéines d'origine transgénique ne migrent pas vers le compartiment non transgénique de l'assemblage (greffon), dans les limites de sensibilité de la RT-PCR et de l'ELISA



HEMMER C., VIGNE E., GOLDSCHMIDT V., KOMAR V., MARMONIER A., VALAT L., DEMANGEAT D., VIGNERON S., MASSON J. & LEMAIRE O. 2009. Transgenic rootstock expressing GFLV CP gene in a three years field trial; resistance assessment, impact on GFLV diversity and exchanges between rootstock and scion. 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG). Dijon, 31 August – 4 September 2009, *Le Progrès Agricole et Viticole*, 228-229.



* from the greenhouse



Impact environnemental du transgène bactérien *nptII*, sur les bactéries du sol

modèle espèce ligneuse - transgène *nptII*

Collaboration en cours avec l'ECL/CNRS/Université de Lyon

- Quel est le taux de bactéries du sol naturellement résistantes à la kanamycine ?
- Variabilité naturelle de ce gène bactérien ?

Quantification de *nptII* et *nptIII* dans différents sols
en présence ou non de porte-greffe OGM *nptII*

	Quantification par Q-PCR : copies/g de sol	
	npt II	npt III
Sol prairie Rothamsted	1,00E+06	1,00E+07
Sol viticole parcelle - non OGM	3,00E+04	2,00E+06
Sol viticole parcelle - OGM	4,00E+04	1,00E+06
Sol viticole serre - non OGM	5,00E+05	7,00E+08
Sol viticole serre - OGM	2,00E+05	6,00E+07

MATHIEU, A.C. DELMONT, T. AL JOUDA, M. LEMAIRE, O. VOGEL, T.M. & SIMONET, P., 2010.
Natural occurrence of resistance genes : risk assessment of the *nptII* gene in transgenic field. 13th
International Symposium of the *International Society for Microbial Ecology* (ISME), 22-27
August 2010, Seattle -WA- USA, Proceedings.

Mécanisme et durabilité de la résistance au GFLV ?



Infection virale (GLRaV, GVA...)

Propagation du virus du greffon au porte greffe

Contournement de la résistance vis-à-vis du GFLV par les suppresseurs endogènes et/ou exogènes de silencing ?

Porte greffe OGM résistant au GFLV, par protection dérivée du pathogène

Transmission de l'ArMV



- 3- Mécanisme et durabilité de la résistance d'origine épigénétique : rechercher le(s) suppresseur(s) de « gene silencing » chez le GFLV
-

Caractérisation du suppresseur de « gene silencing » chez le GFLV : 3 stratégies sont testées

INDUCTION AND SUPPRESSION OF RNA SILENCING: INSIGHTS FROM VIRAL INFECTIONS

Olivier Voinnet

NATURE REVIEWS | GENETICS

© 2005 Nature Publishing Group

VOLUME 6 | MARCH 2005 |

Table 1 | **RNA-silencing suppressors encoded by plant, insect and vertebrate viruses**

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 Citrus tristeza virus	P21	Replication enhancer	123
		P20	Replication enhancer	124
		P23	Nucleic-acid binding	
		CP	Coat protein	
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.

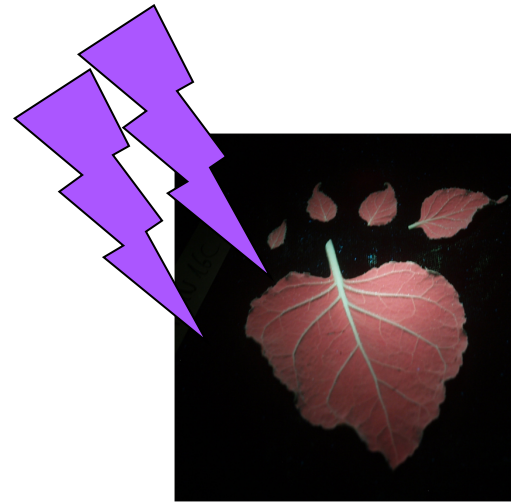
Stratégie sélectionnée -*N. benthamiana* « 16C »

Cette lignée transgénique de *N. benthamiana* exprime la protéine **GFP** (Green Fluorescent Protein) visualisée sous excitation UV



Wt

(excitation de la
chlorophylle)



16C

Le silencing de la GFP peut être induit en agroinfiltrant les 16C avec une agrobactérie (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) contenant un vecteur binaire exprimant soit :

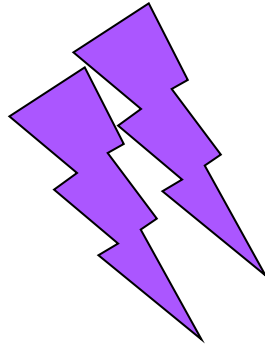
- * La **GFP** (la même séquence que celle insérée dans le génome des 16C)
- * une construction **hairpin de la GFP** appelée **GFFG** (meilleure induction du PTGS)

Le PTGS est initié dans la zone infiltrée puis se propage dans toute la plante

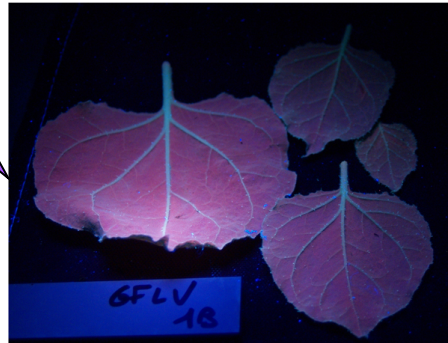
L'activité biologique de candidats potentiels, suppresseur de gene silencing peut être alors étudiée

Gene silencing de la GFP des 16C et inhibition partielle de son silencing par le GFLV

(V. Goldschmidt et L. Valat)



16C + GFLV



Expression de la GFP

16C + pbinGFFG



Silencing de la GFP

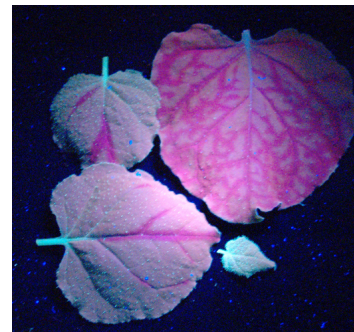
The leaves were photographed under UV light (100 W hand-held long-wave ultraviolet lamp)

16C + pbinGFFG + P19 TBSV

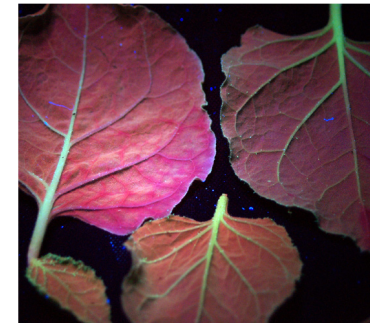


Suppression totale du silencing GFP par le suppr P19

16C + pbinGFFG + GFLV



Suppression partielle du silencing GFP par le GFLV : **présence d'un supprimeur faible ou à mécanisme différent de celui de la P19**



ELISA GFLV +



Conclusion intermédiaire

Nous disposons d'un dispositif très efficace de phénotypage au court-noué, hors confinement – expertise unique au plan international s'appuyant sur une démarche de recherche participative

L'ARNi basée sur la seule stratégie "CP" médiée par le PG ne semble pas bien fonctionner, en particulier hors-confinement – Nécessité d'acquérir des connaissances fondamentales sur l'épigénétique chez la vigne

➤ Comment fonctionne le silencing chez la vigne ?

Séquençage du génome, orthologues DCLs, RDRs, Ago, lignée 40024 sensible au GFLV, étude des dérégulations épigénétiques...

➤ Caractérisation du suppresseur (VSR) et de sa variabilité, construction d'un mutant de GFLV déficient en VSR pour l'étude du RNAi chez 40024...

➤ Banques de petits ARNs et séquençage par *Solexa (Illumina)*, "hot-spots" de silencing sur les RNAs du GFLV...

Intégration d'autres stratégies RDP et génétiques :

➤ Stratégie "hairpin" multivirales ? amiRNA ?

➤ Construction de clones hypo-agressifs d'ArMV ou GFLV ?

➤ Pyramidage de résistance ; combinaison de l'ARNi et la résistance au vecteur ?

➤ Recherche de résistances naturelles récessives chez *V. vinifera* ?

Itinéraires techniques innovants ? ...





Recherche et évaluation de gènes de résistance naturels au virus chez des accessions de *Vitis vinifera*

- Recherche de résistance récessive au virus, basée sur l'inhibition d'une étape clé de la multiplication virale chez des lignées de *Vitis vinifera* issues d'autofécondation - approche gène candidat – eIF4E, iso4E, 4G... - **ANR Movie**





Gestion intégrée de la santé de la vigne

lutter efficacement **vis-à-vis du court-noué** impliquera l'intégration de plusieurs stratégies, y compris l'ARN interférence

Résistance à *Xiphinema index* :
PG avec origine génétique
Vitis rotundifolia, autres *Vitis spp*
en cours...

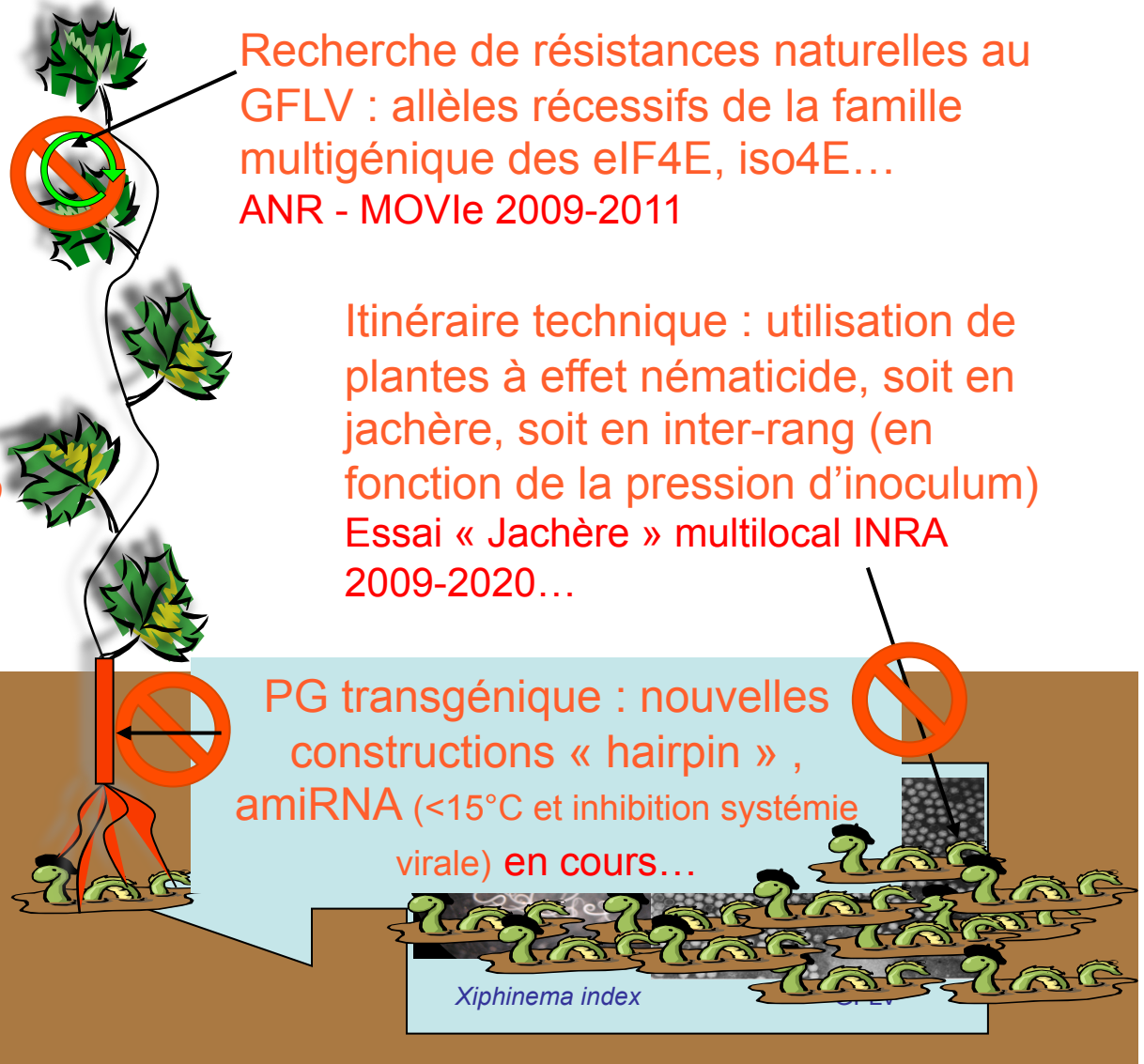
Recherche de résistances naturelles au
GFLV : allèles récessifs de la famille
multigénique des *elf4E*, *iso4E*...
ANR - MOVIE 2009-2011

Itinéraire technique : utilisation de
plantes à effet nématocide, soit en
jachère, soit en inter-rang (en
fonction de la pression d'inoculum)
Essai « Jachère » multilocal INRA
2009-2020...

PG transgénique : nouvelles
constructions « hairpin »,
amiRNA (<15°C et inhibition systémique
virale) en cours...

Transmission GFLV et ArMV

Xiphinema index





Vers la gestion intégrée de la santé de la vigne appliquée au court-noué ; prise en compte des demandes de la profession, de l'aspect sociétal, intégration de composantes telles que paysagères, biodiversité...

7 septembre 2009 : 1^{er} saccage – 1 individu



Juin - juillet 2010 – greffage de l'essai



Les Faucheurs volontaires ont détruit, le 15 août à Colmar, des plants de vigne transgénique qui faisaient l'objet d'une collaboration inédite entre l'INRA, les viticulteurs et des associations. Retour sur cette expérience inachevée

Jérôme Penoglio
Colmar, envoyé spécial

Bien sûr, ils sont d'abord constatés l'effacement et la dégradation de la grappe d'encépitation, les traces de pas dans la boue vers quelques mètres carrés, au centre de la parcelle, où seuls les plants de vigne transgéniques ont été semés. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

Précédemment, les représentants de la recherche et de l'agriculture, Valérie Pécresse et Bruno Le Maire, pour signer leur vœux, mardi après-midi. Là aussi, en rencontrant les scientifiques, toujours sous le choc de la perte de l'objet de leur recherche. Cette fois, c'est l'association des faucheurs volontaires de rétroaction de l'essai qui a été entièrement détruite, affirme la responsable de l'expérience, Olivier Lemaire, par comparaison avec les précédentes déprédations, menées par un individu isolé, en septembre 2009, qui n'avait pas empêché l'essai en plein air de reprendre et d'être prolongé pour cinq nouvelles années.

Mais le président du comité ONA de Colmar, Jean Masson, qui a refusé la destruction temporaire de ce déplacement. La graine brève que les deux ministères ont accepté à discuter avec quinze de membres du comité local de vignerons, élus, viticulteurs, responsables syndicaux et associatifs qui ont encadré, depuis cinq ans, cet essai de vigne génétiquement modifiée.

M. Masson a refusé l'expérience modifiée et s'est produit de fruit, quel que soit l'impact des dommages. Les responsables politiques de l'opinion de ce qui s'est passé, et de l'intérêt de décliner l'essai de cette nouvelle manière de concevoir la science. Cette volonté commune, entre chercheurs et membres de la société civile, a été extrêmement hostile aux organismes génétiquement modifiés (OGM), de défricher un terrain d'essai sur le sujet. Cette ouverture d'esprit qui contraste avec les barrières et les canaux de surveillance qui protègent, en vain, la parcelle transgénique de Colmar.

Ce processus a été beaucoup plus pénible que celui de Jean Masson, chercheur travaillant depuis plusieurs années par la destruction du lien qui unissait la science et la société. Le généticien n'a pas pu imposer d'emblée que pour les viticulteurs, et les valeurs qui lui sont associées, les OGM ne sont pas des plantes, mais que des expériences. L'essai de plants transgéniques a permis d'élucider la relation entre les mécanismes de défense de la plante contre certaines maladies.

Lorsqu'il a été la présidence du comité de Colmar, il y a sept ans, celui-ci a mené des plants génétiquement modifiés provenant d'un essai mené par l'INRA dans son vignoble champenois. Il l'a interrompue parce que la firme craignait pour l'image de ses produits. L'idée était de tester la résistance de ces plants aux virus, mais un virus relativement courant dans le vignoble français, transmis par des vers microscopiques, a été transmis à ces plants, et ceux-ci ont été détruits. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

OGM Arrachage en terrain d'entente



Les faucheurs volontaires ont détruit les plants de vigne transgénique, le 15 août à Colmar. En bas, Olivier Lemaire, responsable scientifique de l'expérience, constate la dégradation. FAUCHEURS VOLONTAIRES/LE MONDE

Déclencheur de relations ou test en plein air, dans un contexte de plus en plus difficile, les premiers observations publiées en 2009 ne confirment pas cette hypothèse. Seul le porte-greffe reste, au bout de quelques années d'essai, transgénique.

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

re-selle la capacité de retarder l'apparition de la maladie. Si la recherche publiée, les premières observations publiées en 2009 ne confirment pas cette hypothèse. Seul le porte-greffe reste, au bout de quelques années d'essai, transgénique.

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

re-selle la capacité de retarder l'apparition de la maladie. Si la recherche publiée, les premières observations publiées en 2009 ne confirment pas cette hypothèse. Seul le porte-greffe reste, au bout de quelques années d'essai, transgénique.

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

Mais cette nouvelle, qui pourrait limiter l'expansion des pathogènes d'une utilisation commerciale de ces plants modifiés, est annulée par une autre : la mutation génétique ne rend pas la plante résistante au virus. Tout fait lui confie-

opposés au OGM, avaient une autre raison de s'opposer à l'essai de la vigne transgénique. Les faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

Précédemment, les représentants de la recherche et de l'agriculture, Valérie Pécresse et Bruno Le Maire, pour signer leur vœux, mardi après-midi. Là aussi, en rencontrant les scientifiques, toujours sous le choc de la perte de l'objet de leur recherche. Cette fois, c'est l'association des faucheurs volontaires de rétroaction de l'essai qui a été entièrement détruite, affirme la responsable de l'expérience, Olivier Lemaire, par comparaison avec les précédentes déprédations, menées par un individu isolé, en septembre 2009, qui n'avait pas empêché l'essai en plein air de reprendre et d'être prolongé pour cinq nouvelles années.

Mais le président du comité ONA de Colmar, Jean Masson, qui a refusé la destruction temporaire de ce déplacement. La graine brève que les deux ministères ont accepté à discuter avec quinze de membres du comité local de vignerons, élus, viticulteurs, responsables syndicaux et associatifs qui ont encadré, depuis cinq ans, cet essai de vigne génétiquement modifiée.

M. Masson a refusé l'expérience modifiée et s'est produit de fruit, quel que soit l'impact des dommages. Les responsables politiques de l'opinion de ce qui s'est passé, et de l'intérêt de décliner l'essai de cette nouvelle manière de concevoir la science. Cette volonté commune, entre chercheurs et membres de la société civile, a été extrêmement hostile aux organismes génétiquement modifiés (OGM), de défricher un terrain d'essai sur le sujet. Cette ouverture d'esprit qui contraste avec les barrières et les canaux de surveillance qui protègent, en vain, la parcelle transgénique de Colmar.

Ce processus a été beaucoup plus pénible que celui de Jean Masson, chercheur travaillant depuis plusieurs années par la destruction du lien qui unissait la science et la société. Le généticien n'a pas pu imposer d'emblée que pour les viticulteurs, et les valeurs qui lui sont associées, les OGM ne sont pas des plantes, mais que des expériences. L'essai de plants transgéniques a permis d'élucider la relation entre les mécanismes de défense de la plante contre certaines maladies.

Lorsqu'il a été la présidence du comité de Colmar, il y a sept ans, celui-ci a mené des plants génétiquement modifiés provenant d'un essai mené par l'INRA dans son vignoble champenois. Il l'a interrompue parce que la firme craignait pour l'image de ses produits. L'idée était de tester la résistance de ces plants aux virus, mais un virus relativement courant dans le vignoble français, transmis par des vers microscopiques, a été transmis à ces plants, et ceux-ci ont été détruits. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

Précédemment, les représentants de la recherche et de l'agriculture, Valérie Pécresse et Bruno Le Maire, pour signer leur vœux, mardi après-midi. Là aussi, en rencontrant les scientifiques, toujours sous le choc de la perte de l'objet de leur recherche. Cette fois, c'est l'association des faucheurs volontaires de rétroaction de l'essai qui a été entièrement détruite, affirme la responsable de l'expérience, Olivier Lemaire, par comparaison avec les précédentes déprédations, menées par un individu isolé, en septembre 2009, qui n'avait pas empêché l'essai en plein air de reprendre et d'être prolongé pour cinq nouvelles années.

Mais le président du comité ONA de Colmar, Jean Masson, qui a refusé la destruction temporaire de ce déplacement. La graine brève que les deux ministères ont accepté à discuter avec quinze de membres du comité local de vignerons, élus, viticulteurs, responsables syndicaux et associatifs qui ont encadré, depuis cinq ans, cet essai de vigne génétiquement modifiée.

M. Masson a refusé l'expérience modifiée et s'est produit de fruit, quel que soit l'impact des dommages. Les responsables politiques de l'opinion de ce qui s'est passé, et de l'intérêt de décliner l'essai de cette nouvelle manière de concevoir la science. Cette volonté commune, entre chercheurs et membres de la société civile, a été extrêmement hostile aux organismes génétiquement modifiés (OGM), de défricher un terrain d'essai sur le sujet. Cette ouverture d'esprit qui contraste avec les barrières et les canaux de surveillance qui protègent, en vain, la parcelle transgénique de Colmar.

15 août 2010 2ème saccage – 63 « faucheurs »

L'INRA avait souhaité
doubler l'expérience
scientifique d'une
démarche sociologique

Si il y a quelques mois, M. Masson ne cachait pas avoir rencontré de fortes résistances au sein de l'INRA sur la tournure que prenait le fonctionnement du comité. Pour M. Masson, « personne ne s'oppose à l'essai de cette nouvelle manière de concevoir la science. Cette volonté commune, entre chercheurs et membres de la société civile, a été extrêmement hostile aux organismes génétiquement modifiés (OGM), de défricher un terrain d'essai sur le sujet. Cette ouverture d'esprit qui contraste avec les barrières et les canaux de surveillance qui protègent, en vain, la parcelle transgénique de Colmar.

Ce processus a été beaucoup plus pénible que celui de Jean Masson, chercheur travaillant depuis plusieurs années par la destruction du lien qui unissait la science et la société. Le généticien n'a pas pu imposer d'emblée que pour les viticulteurs, et les valeurs qui lui sont associées, les OGM ne sont pas des plantes, mais que des expériences. L'essai de plants transgéniques a permis d'élucider la relation entre les mécanismes de défense de la plante contre certaines maladies.

Lorsqu'il a été la présidence du comité de Colmar, il y a sept ans, celui-ci a mené des plants génétiquement modifiés provenant d'un essai mené par l'INRA dans son vignoble champenois. Il l'a interrompue parce que la firme craignait pour l'image de ses produits. L'idée était de tester la résistance de ces plants aux virus, mais un virus relativement courant dans le vignoble français, transmis par des vers microscopiques, a été transmis à ces plants, et ceux-ci ont été détruits. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

Précédemment, les représentants de la recherche et de l'agriculture, Valérie Pécresse et Bruno Le Maire, pour signer leur vœux, mardi après-midi. Là aussi, en rencontrant les scientifiques, toujours sous le choc de la perte de l'objet de leur recherche. Cette fois, c'est l'association des faucheurs volontaires de rétroaction de l'essai qui a été entièrement détruite, affirme la responsable de l'expérience, Olivier Lemaire, par comparaison avec les précédentes déprédations, menées par un individu isolé, en septembre 2009, qui n'avait pas empêché l'essai en plein air de reprendre et d'être prolongé pour cinq nouvelles années.

Mais le président du comité ONA de Colmar, Jean Masson, qui a refusé la destruction temporaire de ce déplacement. La graine brève que les deux ministères ont accepté à discuter avec quinze de membres du comité local de vignerons, élus, viticulteurs, responsables syndicaux et associatifs qui ont encadré, depuis cinq ans, cet essai de vigne génétiquement modifiée.

Ce processus a été beaucoup plus pénible que celui de Jean Masson, chercheur travaillant depuis plusieurs années par la destruction du lien qui unissait la science et la société. Le généticien n'a pas pu imposer d'emblée que pour les viticulteurs, et les valeurs qui lui sont associées, les OGM ne sont pas des plantes, mais que des expériences. L'essai de plants transgéniques a permis d'élucider la relation entre les mécanismes de défense de la plante contre certaines maladies.

Lorsqu'il a été la présidence du comité de Colmar, il y a sept ans, celui-ci a mené des plants génétiquement modifiés provenant d'un essai mené par l'INRA dans son vignoble champenois. Il l'a interrompue parce que la firme craignait pour l'image de ses produits. L'idée était de tester la résistance de ces plants aux virus, mais un virus relativement courant dans le vignoble français, transmis par des vers microscopiques, a été transmis à ces plants, et ceux-ci ont été détruits. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).

Précédemment, les représentants de la recherche et de l'agriculture, Valérie Pécresse et Bruno Le Maire, pour signer leur vœux, mardi après-midi. Là aussi, en rencontrant les scientifiques, toujours sous le choc de la perte de l'objet de leur recherche. Cette fois, c'est l'association des faucheurs volontaires de rétroaction de l'essai qui a été entièrement détruite, affirme la responsable de l'expérience, Olivier Lemaire, par comparaison avec les précédentes déprédations, menées par un individu isolé, en septembre 2009, qui n'avait pas empêché l'essai en plein air de reprendre et d'être prolongé pour cinq nouvelles années.

Mais le président du comité ONA de Colmar, Jean Masson, qui a refusé la destruction temporaire de ce déplacement. La graine brève que les deux ministères ont accepté à discuter avec quinze de membres du comité local de vignerons, élus, viticulteurs, responsables syndicaux et associatifs qui ont encadré, depuis cinq ans, cet essai de vigne génétiquement modifiée.

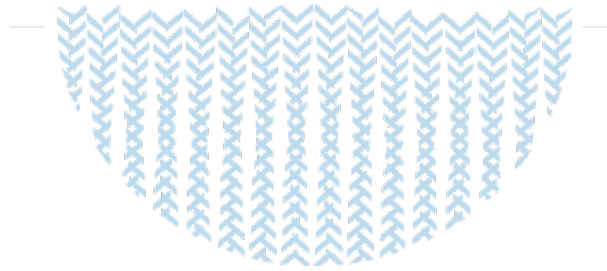
Ce processus a été beaucoup plus pénible que celui de Jean Masson, chercheur travaillant depuis plusieurs années par la destruction du lien qui unissait la science et la société. Le généticien n'a pas pu imposer d'emblée que pour les viticulteurs, et les valeurs qui lui sont associées, les OGM ne sont pas des plantes, mais que des expériences. L'essai de plants transgéniques a permis d'élucider la relation entre les mécanismes de défense de la plante contre certaines maladies.

Lorsqu'il a été la présidence du comité de Colmar, il y a sept ans, celui-ci a mené des plants génétiquement modifiés provenant d'un essai mené par l'INRA dans son vignoble champenois. Il l'a interrompue parce que la firme craignait pour l'image de ses produits. L'idée était de tester la résistance de ces plants aux virus, mais un virus relativement courant dans le vignoble français, transmis par des vers microscopiques, a été transmis à ces plants, et ceux-ci ont été détruits. L'association des faucheurs volontaires, dimanche 15 août à l'Institut de Colmar (Haut-Rhin) de l'Institut national de recherche agroalimentaire (INRA).



24 août 2010 : soutien fort de la part de la DG de l'INRA et de nos deux Ministres de tutelle, pour la reprise des recherches issues d'une démarche de recherche participative

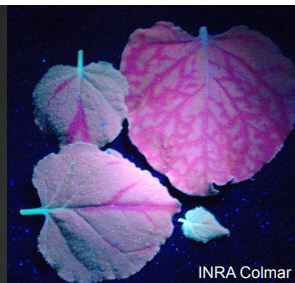




Quels projets pour la poursuite de la thématique de Résistance Dérivée du Pathogène vis-à-vis du GFLV ?



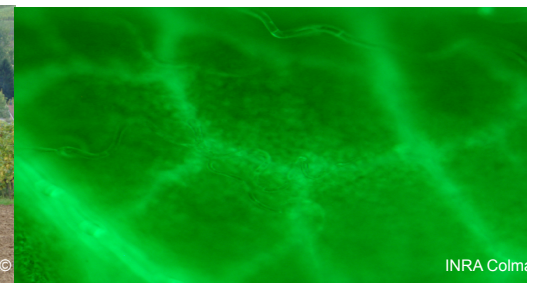
INRA Colmar



INRA Colmar



INRA Colmar©



INRA Colmar



Combinaison d'une résistance au nématode vecteur chez des porte-greffes et de l'ARNi induite par hairpin

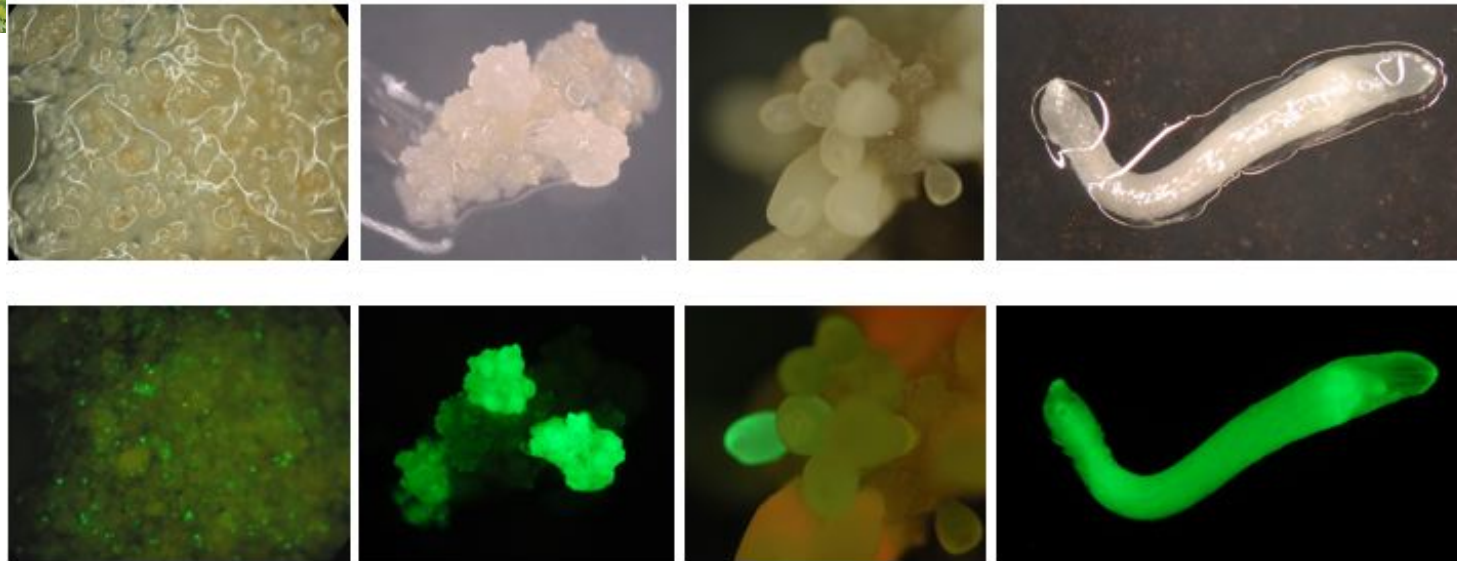
Porte-greffe
résistant au
nématode vecteur
Syrah/**Nemadex AB**



Porte-greffe
conventionnel
Syrah/**SO4**



Transformation de cals embryogènes de Nemadex AB avec la construction VC

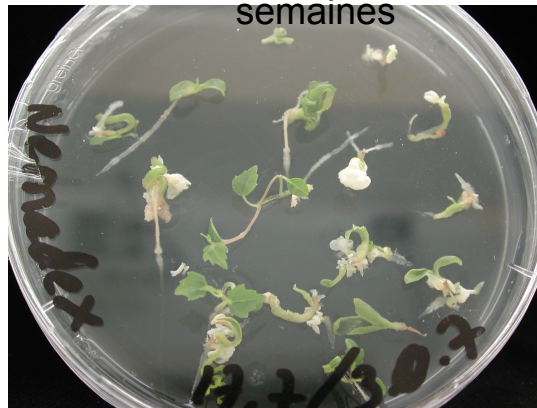


Contrôle de
l'aptitude à la
transformation
du Nemadex AB
- transgène GFP

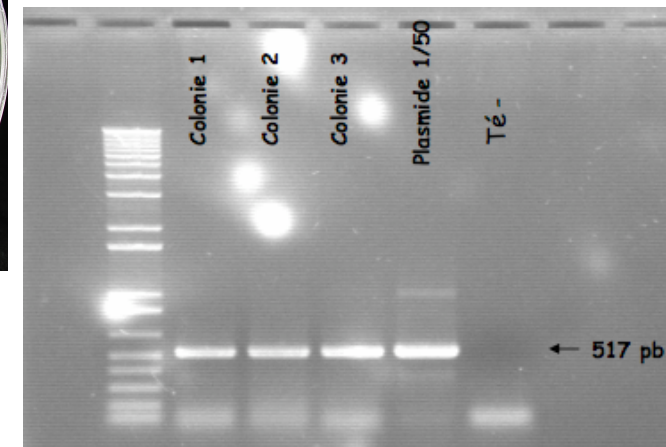
1
semaine

8 semaines

10
semaines



Construction VC dans
l'agrobactérie C58 :
1^{ère} transformation 17/9/10



et de son aptitude à régénérer



Acceptabilité d'une telle approche intégrée faisant appel à l'ARN interférence, induite par transgénèse ?

Poursuite de la démarche de recherche participative et de communication Science-Société sur cette stratégie de rupture

Élimination des gènes marqueurs antibiotiques ?

Séquences *short hairpin RNA* ou *pre-miRNA* artificiels ? ...

Séquences pararétrovirales de 200 à 800 bp intégrées dans 11 des 19 chromosomes de la vigne

Biology Direct



Hypothesis

Open Access

Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance

Christophe Bertsch^{*†1}, Monique Beuve^{†2,3}, Valerian V Dolja⁴,
Marion Wirth^{2,3}, Frédérique Pelsy^{2,3}, Etienne Herrbach^{2,3} and
Olivier Lemaire^{2,3}

Published: 26 June 2009

Biology Direct 2009, 4:21 doi:10.1186/1745-6150-4-21

Received: 10 June 2009

Accepted: 26 June 2009

Fait marquant du SPE pour 2009

**Vérifier cette hypothèse pour ensuite proposer
le concept de *résistance naturelle dérivée du pathogène* ?**

Les difficultés à traiter de questions de recherche liées aux nouvelles technologies : destructions répétées de l'essai OGM de Colmar, co-construit au travers d'une démarche de recherche citoyenne complètement innovante

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS BIOLOGY

Perspective

"Interactive Technology Assessment" and Beyond: the Field Trial of Genetically Modified Grapevines at INRA-Colmar

The Local Monitoring Committee*, Olivier Lemaire, Anne Moneyron, Jean E. Masson*

INRA/UDS, UMR1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, F-68021 Colmar, France



There is increasing interest worldwide in how decision-making processes concerning controversial technological innovations can be improved by better integration of input from society at large. Aiming to gain knowledge on grapevine defence mechanisms against grapevine fanleaf virus (GFLV), a severe disease, scientists wanted to carry out a field trial of genetically modified grapevine rootstocks in Alsace. Three millennia of winemakers' tradition and innovation suddenly collided in this highly reputed cradle of French viticulture. The French Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) used the Interactive Technology Assessment (ITA, Box 1) method in an initial consultation phase to integrate public input and then went beyond ITA to carry out the field trial. The implementation phase was made possible by the involvement of a Local Monitoring Committee (LMC, Box 2) with broad stakeholder representation. In the course of 7-years' work, the LMC built a research-action program which allowed redesigning of the initial GM grapevine research assay, as well as developing innovative trials on environmental impact and organic viticulture.

Over the past decades, society in Europe has experienced repeated crises highlighting cross-relationships between health, politics, science, agriculture, the environment, and society. The immediate effect of these unprecedented crises has

The Perspective section provides experts with a forum to comment on topical or controversial issues of broad interest.

been the growth of doubt, and "the collapse of certainties linked to the idea of guaranteed progress, and collapse of the idea that science and technology can only be beneficial has introduced the worm of uncertainty everywhere" [1]. This change in public attitude in Europe is perfectly illustrated by the acceptability of genetically modified (GM) plants. During the late 80s and early 90s, Europe was a hotbed of research and development concerning GM plants, and numerous field trials were performed without significant public opposition. More recently, attitudes in many European countries have become distinctly anti-GM, as shown by the repeated destruction of field trials of GM crops. Years after the directive 2001/18/EC of European Parliament, the political posture of European countries has still not settled [2].

Nonetheless, there are certain cases where genetic engineering is one of the few means available to solve a major agronomic problem or to study fundamental mechanisms of plant biology, as a first step. For instance, Grapevine fanleaf virus (GFLV), which is transmitted by soil nematodes, is the cause of an often lethal disease of grapevines with worldwide distribution. Until recently, controlling the disease typically involved removing

infected individuals and treating the soil in and around the focus of infection with nematicide fumigants, but this is no longer possible, since these nematicides were banned due to their unacceptable environmental impact. For this reason, researchers at the French Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and several other labs developed potentially GFLV-resistant grapevine rootstocks, on which non-GM scions of the traditional grape cultivars could be grafted [3]. Since the virus is soil-transmitted, the resistance of the rootstocks should be sufficient to protect the scions, thus making it possible to make non-GM wine from the grapes borne by the scions.

Following the authorization of the French Ministry of Agriculture, and based on opinion of the Biomolecular Engineering Commission (B/FR/94-11-04), a first GM rootstock trial was set up in 1996 on a grapevine plot in the Champagne region that was affected by GFLV. Analyses performed on the plot suggested that the GM rootstocks could delay the onset of GFLV infection by at least three years [3] (Figure 1). The researchers wanted to confirm these preliminary results, to determine the mechanism of this resistance to the disease, and also assess its sustainability and environmental

Citation: The Local Monitoring Committee, Lemaire O, Moneyron A, Masson JE (2010) "Interactive Technology Assessment" and Beyond: the Field Trial of Genetically Modified Grapevines at INRA-Colmar. *PLoS Biol* 8(11): e1000551. doi:10.1371/journal.pbio.1000551

Academic Editor: Nikolas Rose, London School of Economics and Political Science

Published: November 30, 2010

Copyright: © 2010 LMC et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by the INRA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jean.masson@colmar.inra.fr

* The Local Monitoring Committee comprises members from the Alsace winegrowing profession, the Association of Alsace Winegrowers, the Institut National des Appellations d'Origine, the Alsace Consumers Association, the Agricultural and Viticultural Training School, an agricultural union (la Confédération Paysanne), a nature preservation society (Alsace Nature), an independent vinegrower, a neighbour of the trial site, a representative from the Plant Protection Services (DRAAF), a representative from the Regional Directorate for the Environment (DIREN), an elected representative from the Regional Council, an elected representative from the Town Council, the researcher managing the research programme, and the President of the INRA Centre in Colmar, who acts as moderator.



UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin



Et ailleurs dans le monde ...

On arrive bientôt à 200 millions d'ha de cultures d'OGM (toutes cultures confondues)

Article dans le **Wine Spectator** du 15 décembre 2010) – Vignes OGM



GRAPES

TRANS- FORMED

GENETIC ENGINEERING MAY OFFER DISEASE-PLAGUED GRAPEVINES A LIFELINE, BUT THE HURDLES ARE HIGH

BY LIZA GROSS

Grapegrowers face difficult questions as they try to protect their vines from disease. Is it better to use chemical treatments, with their financial and environmental costs? Or should growers risk public outcry and experiment with genetic engineering?

To preserve a variety's classic character, farmers have traditionally propagated grapevines (and other crops) as cuttings. But growing these genetically identical vines in single-variety vineyards within a winegrape monoculture (the industry standard) makes them highly vulnerable to disease. As a result, growers are forced to apply repeated chemical treatments to keep vines healthy and productive, at considerable economic and environmental expense. Many scientists believe genetic engineering could reduce these costs,

but it faces stiff resistance from both vintners and consumers.

Failure to control fungal diseases such as powdery mildew and downy mildew—the biggest disease threats facing grapegrowers—can lead to stunted berry growth, reduced yields and off flavors in wine. In 2008, growers doused California grapevines with more than 18.5 million pounds of fungicides, representing more than 92 percent of all pesticides used in California vineyards. And though grapevines account for only about 8 percent of total crop acreage in Europe, a 2003 European Union-funded report revealed that their cultivation is responsible for 70 percent of fungicide use.

But if genetically modified crops are vilified as “Frankenfoods,” the heavy use of chemicals is increasingly unpopular. In January 2009, the European Parliament voted to drastically reduce appli-

En Australie - cis-génèse de gènes de résistance au mildiou et à l'oïdium

En France - connaissances sur la RDP chez la vigne, médiée par le porte-greffe

cations of highly toxic agricultural chemicals, requiring member states to implement "sustainable use of pesticides" by early 2011. The measure's revised safety criteria will likely outlaw many fungicides and compounds used to control grapevine pathogens.

That may force consumers to make tough choices. "You'll be faced with the prospect of drinking no wine, drinking organic wine at a higher price, or drinking low chemical-input, genetically engineered wine at a lower price," says Ian Dry, principal research scientist at CSIRO Plant Industry in South Australia.

But even organic wines require copper and sulfur sprays—sulfur accounts for the lion's share of fungicide use—which at high concentrations can harm soil microbes and pollute groundwater. "If you think about it," Dry muses, "a genetically engineered wine with a resistance gene is really the ultimate organic vine."

Developing grapevines with inherent resistance to the various pests that haunt vineyards is a top priority for genetic engineering programs. Although fungal diseases are the most common grapevine malady, numerous insects, viruses and bacteria can also wreak havoc in vineyards.

In addition, new threats can appear without warning. French growers didn't worry about phylloxera until the tiny root louse showed up on vines imported from America in the 1860s. Despite its discovery in the late-19th century, Pierce's disease wasn't on the radar of Southern California vintners until the glassy-winged sharpshooter invaded Temecula Valley in the late 1990s. And just last year, Napa growers discovered a new pest in their midst: the European grapevine moth. This Italian native packs a triple punch in a single season, as three generations of larvae attack flowers, then developing berries and finally mature grapes, which then fall prey to botrytis bunch rot and other fungal infections.

Conventional plant breeders are trying to protect against such threats and reduce the need for chemicals by crossing the disease-plagued European *Vitis vinifera* vines, which make almost all the world's fine wines, with naturally hardy American species.

To make resistant rootstocks or scions (the vines grafted onto the rootstock) with conventional approaches, breeders germinate seeds from an American species that is resistant to a specific pest or disease, then cross-pollinate the flowering plants with a *Vitis vinifera* plant. Offspring that show resistance are then "backcrossed" to the *vinifera* plant over and over to wind up with a disease-resistant facsimile of the original.

"That works fine with wheat because you can do a couple of generations a year," explains CSIRO's Dry. "But with grapevines,



Ian Dry

"YOU'LL BE FACED WITH THE PROSPECT OF DRINKING NO WINE, DRINKING ORGANIC WINE AT A HIGHER PRICE, OR DRINKING LOW CHEMICAL-INPUT, GENETICALLY ENGINEERED WINE AT A LOWER PRICE."

normally it's about three years from the time you plant the seed to the time you get some flowers to do the crossing, so adding each generation, it's a lifetime's work."

Genetic engineering dramatically accelerates this process by inserting genes for resistance directly into a grapevine's genome. Researchers have two ways to do this. One technique co-opts a natural plant gene-delivery system used by the soil bacterium that causes crown gall disease. The other uses high-powered "gene guns" to bombard plant cells with tiny DNA-coated particles.

But genetic engineering's greatest advantage for wine grapes may be its potential to confer resistance without changing a variety's notable qualities—theoretically allowing wineries to call a modified variety by its well-known name.

Since 1995, more than 50 permits for trials on genetically modified, or "transgenic," grapes have been approved by the United States Animal and Plant Health Inspection Service. Other grapegrowing countries, including Chile, Germany, Australia and France, also have ongoing trials, most of which aim to evaluate disease resistance.

So far, results have been mixed. Some transgenic vines are showing promise in field trials, and small batches of genetically modified Riesling made in Germany proved indistinguishable from non-modified Rieslings in sensory tests. Progress has been hampered in part by scientific hurdles, but mostly by public resistance.

Consumer concerns focus on safety and whether GM vines might contaminate wild or organic vines. Organic vintners worry that the cultivation of GM grapevines could compromise their organic certifications. Keenly aware of such concerns, the Wine Institute, the California wine industry's leading advocate, asserts that "no genetically modified organisms be used in the production of California wine."

Moët & Chandon was an early supporter of genetic engineering technology. The famed Champagne producer teamed up with the French government in the '80s to explore its potential in the vineyard and participated in one of the first transgenic field trials in 1996.

The trial, led by Olivier Lemaire, a researcher at the National Institute for Agronomic Research in Colmar, France, tested GM rootstocks' ability to tolerate grapevine fanleaf virus under vineyard conditions. Fanleaf disease can slash crop yields—up to 80 percent for vulnerable varieties like Chardonnay and Pinot Noir—by killing flowers and preventing fruit formation, and produces high-acid, low-sugar grapes that make poor quality wines.

Because no wild or cultivated grape shows natural

INRA'S LEMAIRE HAS WORKED EXCLUSIVELY WITH ROOTSTOCK TO DEVELOP VIRUS RESISTANCE. ALTHOUGH THE ROOTSTOCK WOULD BE TRANSGENIC, THE GRAFTED SCION WOULD NOT, WHICH HE HOPED WOULD QUIET CRITICISM.



Olivier Lemaire

En France, où on s'intéresse de près aux interrogations de la société et aux réactions de certains extrémistes

Il y a aux USA, au Chili et peut-être en Australie et en Chine des essais de vignes biotechnologiques, développées pour la résistance aux pathogènes de la vigne



A plot of genetically modified grapevines in Alsace before an August attack (left), and after (right). The sign left by perpetrators translates as: "[The] wrong solution for the wrong problem."

resistance to fanleaf virus—or to the 55 other viruses that infect grapes—conventional breeding isn't an option. Even chemicals aren't reliable. Lemaire thinks genetic engineering offers the best shot at controlling these debilitating pathogens.

Lemaire's group inserted a gene segment from the virus into the genome of a rootstock used to grow white grape varieties. The technique works like a vaccine, exposing the plant to viral pathogens to stimulate its natural defenses.

"We are working exclusively with the rootstock to develop rootstock-mediated resistance," Lemaire says. By making the rootstock "immune" to the virus, transmitted by tiny soil-dwelling worms, Lemaire hopes to protect the grafted scion. Although the rootstock is transgenic, a grower can use Chardonnay or Shiraz or any scion of preference and keep the fruit and wine traditional. It's an approach Lemaire hoped would be less objectionable.

Three strains of transgenic rootstocks were showing good resistance to virus infection, but public concerns about growing GM plants in an open vineyard forced an end to the trial in 1999.

Lemaire, working with grapevine virologist Marc Fuchs, took the three promising rootstock lines and grafted 70 nonmodified grapevines onto them in a new field experiment—this time within the confines of INRA's grounds in Alsace. He thought the move would appease critics. He was mistaken.

In September 2009, a man sneaked into INRA's experimental plots and cut every transgenic plant just under the graft junction between the rootstock and scion. The plants had been growing for three years, with promising results. Lemaire re-grafted non-GM scions onto the rootstocks to try again. But this past August, activists uprooted and destroyed the vines. The researchers lost seven years of work and about 1.2 million euros. (See "French Activists Destroy Experimental Vineyard," www.winespectator.com/121510.)

Moët & Chandon no longer invests in genetic research, says spokesperson Jean Berchon, but maintains ties with INRA researchers "just in case." Lack of consumer and political support for the technology remains a major obstacle to using it, he says. "In Europe, few people actually seem ready to try."

While the global market for biotech agriculture continues to grow—in 2008, more than 300 million acres were planted to GM crops such as corn and soy—the future for GM grapevines remains uncertain. One stumbling

block is whether wines made from GM grapes could be labeled and sold under classic varietal names. The only known evaluation of wine produced from GM vines, the GM Riesling made in Germany, supports scientists' predictions that genetic engineering methods wouldn't harm wine quality.

As part of a multiyear experiment started in 1999, to test GM Riesling grapes' resistance to fungal pathogens, small batches of GM Riesling were compared with unmodified Riesling, says Rudolf Eibach, a researcher at the Institute of Grapevine Breeding in Siebeldingen, Germany. "Wines were tasted together and it was found over several years that an organoleptic [sensory] differentiation of the individual variants was not possible."

Ironically, the GM Riesling vines, engineered with barley genes that attack fungal cells, proved just as vulnerable to infection as the unmodified vines. As a result, researchers pulled all 600 GM vines that had been planted in two locations in Rhineland Palatinate, the heart of German wine country.

Another strategy, which takes genes only from other grape species, may prove more promising. Dry takes this approach to transfer resistance genes from a mildew-resistant American species into vulnerable Shiraz and Chardonnay vines without "taking the bad genes" associated with American vines' off flavors. And because he's working only with grape genes, "the thing we produce is about as close to a natural grapevine as we can get."

Dry thinks this strategy might even pass muster with the International Organization of Vine and Wine, which oversees varietal authenticity. But at this point, no one is growing genetically engineered grapevines commercially to test this possibility.

Bruce Reisch, professor of grapevine breeding and genetics at Cornell University, is testing transgenic Chardonnay vines for crown gall resistance in field trials, but he's focusing less on genetic engineering. GE trials require far more funding and labor than conventional trials to quarantine the vines, prevent cross-pollination with other grapes, and keep the berries away from hungry wildlife.

Reisch thinks the market might eventually accommodate transgenic grapes if they were the only defense against pest and disease pressures, and cites as an example the odious Pierce's disease. Once a vine is infected, nothing can save it. Should it become a serious problem again, "and other methods to control it fall flat," he says, "I think people will begin to accept it."

Liza Gross is a freelance journalist based in Kensington, Calif.



14 octobre 2011 : délibéré du procès des 62 faucheurs ; les chercheurs de Colmar se mobilisent pour défendre la recherche scientifique publique, leur outil de travail et leur « ras-le-bol » des amalgames



Collaborations parmi les plus significatives

INRA Colmar :

Équipes ViVe, et GAV
UE et SDAR

ECL/Université de Lyon

Pascal Simonet et
son équipe

IBMP/Université de Strasbourg :

Équipes GFLV

INRA Bordeaux :

Equipe Virologie
Nathalie Ollat et son
équipe

Epigénétique

INRA Montpellier :

Alain Bouquet

ENITAB

Bordeaux :

Maarten van
Helden et son
équipe

INRA Sophia-Antipolis :

Daniel Esmenjaud et son
équipe

UHA Colmar :

Christophe Bertsch,
Et son équipe

Cornel University, USA :

Marc Fuchs et son équipe

Oregon State Univ, USA :

Valerian Dolja

Merci de votre attention



