

**AFPP – 11^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES RAVAGEURS ET AUXILIAIRES EN AGRICULTURE
MONTPELLIER – 25 ET 26 OCTOBRE 2017**

**TRANSMISSION DU VIRUS Y DE LA POMME DE TERRE PAR LES CICADELLES DE LA SOUS-FAMILLE
DES TYPHLOCYBINAÉ**

M. KHELIFA⁽¹⁾, A. DEPARROIS⁽¹⁾, V. LECONTE⁽²⁾, P. LEBECQUE⁽²⁾, V. DEVEAUX-GOBERT⁽³⁾

⁽¹⁾ Semences, Innovation, Production, Recherche et Environnement. Centre de ressources régionales en biologie moléculaire. Université de Picardie Jules Verne. 33 rue St Leu, 80039 AMIENS – France - mounia.khelifa@u-picardie.fr

⁽²⁾ Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles de Picardie. 19 bis rue Alexandre Dumas, 80096 AMIENS Cedex 3 – France – vleconte.fredonpic@orange.fr / plasue.fredonpic@orange.fr

⁽³⁾ Semences, Innovation, Production, Recherche et Environnement. Rue des Champs Potez, 62217 ACHICOURT – France – virginie.deveaux@comitenordplant.fr

RÉSUMÉ

L'un des problèmes sanitaires majeurs de la culture de pomme de terre (*Solanum tuberosum* .L) est causé par le virus Y ou le *Potato Virus Y* (PVY). A ce jour, seuls les pucerons, qu'ils soient inféodés ou non à la culture, sont décrits comme vecteurs de ce virus avec environ 70 espèces recensées (Pelletier *et al.*, 2012). Or des relevés de piégeages réalisés en 2014 (SIPRE-FREDON) dans le nord de la France révèlent la prévalence d'insectes piqueurs-suceurs appartenant à un ordre taxonomique différent des pucerons ; il s'agit de cicadelles de la sous-famille des Typhlocybinae. L'analyse des spécimens piégés indique qu'un certain nombre d'entre eux étaient porteurs du PVY. Des tests de transmission en condition de choix ou sur plantes individuelles réalisés à partir de cicadelles piégées ont révélé que ces dernières ont la capacité de transmettre le virus Y. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois que les cicadelles de la sous-famille des Typhlocybinae sont vectrices d'un virus non circulant et mettent en exergue un nouveau risque sanitaire lié à ces ravageurs.

Mots-clés : Virus Y, Pomme de terre, Cicadelle, Typhlocybinae, Puceron.

ABSTRACT

TRANSMISSION OF POTATO VIRUS Y BY LEAFHOPPER FROM THYPHLOCYBINAÉ SUB-FAMILY

One of the major sanitary problems affecting potato (*Solanum tuberosum* .L) crop is caused by the *Potato Virus Y* (PVY). It is well known that the PVY is only transmitted by aphids colonizing potatoes (Radcliffe and Ragsdale, 2002), and non-colonizing species which contribute significantly to its spread (Pelletier *et al.*, 2008; Verbeek *et al.*, 2010). Trapping carried out in 2014 in several potato fields distributed in the north of France revealed the prevalence of sap-sucking insects belonging to a taxonomic order different from the aphids, the leafhoppers of the Typhlocybinae subfamily. The analysis of the trapped specimens indicates that a number of them were contaminated by PVY and the transmission tests have revealed that the leafhoppers are able to transmit the virus. These results show for the first time that the leafhoppers of the Typhlocybinae subfamily are vectors of a non-circulative virus and highlight a potential phytosanitary risk for potato crop.

Keywords: *Potato Virus Y*, Potato, Leafhopper, Typhlocybinae, Aphid.

INTRODUCTION

La région des Hauts de France fournit les deux tiers de la production nationale de pomme de terre avec plus de 3,5 millions de tonnes en 2015 (CNIPT, 2015). Cette culture est soumise aux attaques de nombreux bio-agresseurs dont les plus importants sont les insectes ravageurs (doryphores, pucerons, nématodes...), les champignons (mildiou, alternariose...), les bactéries et les virus ayant pour conséquence une réduction des rendements.

En France, l'un des problèmes sanitaires majeurs sur la culture de pomme de terre concerne le virus Y de la pomme de terre, le *Potato Virus Y* ou PVY pouvant entraîner des pertes de rendement allant de 40 à 70 % des récoltes dans les parcelles infectées (Blanchard, 2007). La transmission de ce virus d'une plante à une autre est assurée par des insectes piqueurs-suceurs sur le mode non circulant. Ils acquièrent ou inoculent le virus lors des piqûres alimentaires qu'ils effectuent sur le feuillage. Actuellement, environ 70 espèces de pucerons ont été identifiées comme vecteurs potentiels du PVY (Pelletier *et al.*, 2012). Cependant, le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* est le vecteur le plus efficace dans la transmission de ce virus en conditions contrôlées (Van Hoof, 1980).

Même s'il existe un lien étroit entre la pression des populations de pucerons présents sur une parcelle et l'intensité des infections par le PVY qui se révèlent ultérieurement, cette corrélation n'est pas toujours avérée. En effet, il a été constaté (source Comité Nord) que des années à faibles pressions en pucerons peuvent s'accompagner d'un fort niveau d'infection des lots de pomme de terre par le PVY. Au-delà de l'aspect multifactoriel de la transmission du PVY (i.e. l'état sanitaire de la semence, les variétés utilisées et l'environnement), ce type de constat laisse supposer qu'un autre cortège d'insectes, qui ne fait pas l'objet de surveillance, pourrait être à l'origine de ces épidémies.

Une de nos hypothèses de travail est que les cicadelles de la sous-famille des Typhlocybae présentes en parcelles de pomme de terre dans le bassin de production nord de France puissent avoir un rôle dans la transmission de ce virus.

En effet, les cicadelles sont des insectes piqueurs-suceurs qui s'alimentent de la sève des plantes. Lorsqu'elles piquent, elles insèrent leur stylet dans la plante afin de briser les cellules tout en injectant une salive contenant des enzymes permettant de liquéfier et d'aspirer leurs contenus (Tjallingii and Esch, 1993). Leur mode d'alimentation à travers l'ingestion de la sève végétale en font de bons vecteurs d'agents phytopathogènes transportés via leur salive. En effet, les espèces appartenant à la famille des Cicadellidae sont connues pour être actives dans la transmission de phytoplasmes tels que le *Rice yellow dwarf*, véhiculé par plusieurs cicadelles du genre *Nephotettix* (Nakashima and Murata, 1993), ou la flavescence dorée, transmise par *Scaphoideus titanus* (Foissac and Wilson, 2010), étant connue pour être l'une des maladies les plus spectaculaires sur la vigne.

D'autre part, des études préliminaires menées par la SIPRE en collaboration avec la FREDON de Picardie, ont permis de constater que plusieurs espèces de cicadelles Typhlocybae étaient présentes en végétation de pomme de terre et qu'un certain nombre étaient en outre porteuses du virus. En effet, lors de la campagne de piégeage de 2014 sur une parcelle de Saily-Flibeaucourt (80), 79 % des Homoptères capturés en végétation par un aspirateur de type D-Vac étaient des cicadelles de la sous-famille des Typhlocybae (Figure 1). Parmi celles-ci, 25 % sont détectées comme porteuses du PVY (Figure 2).

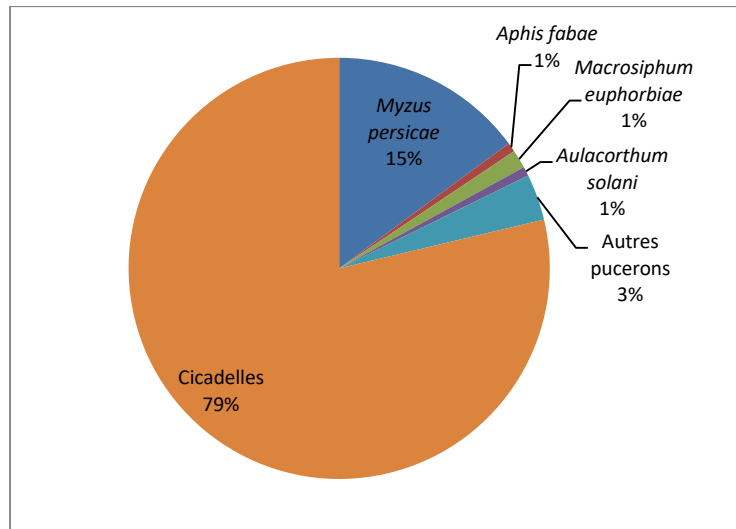


Figure 1 : Pourcentage de présence des Homoptères sur la végétation de pomme de terre à Sully-Flibeaucourt (80) lors des piégeages à l'aide d'un aspirateur D-Vac durant la campagne 2014
 Percentage of Homoptera presence on potato field trapped with D-Vac vacuum during summer 2014 in Sully-Flibeaucourt (80)

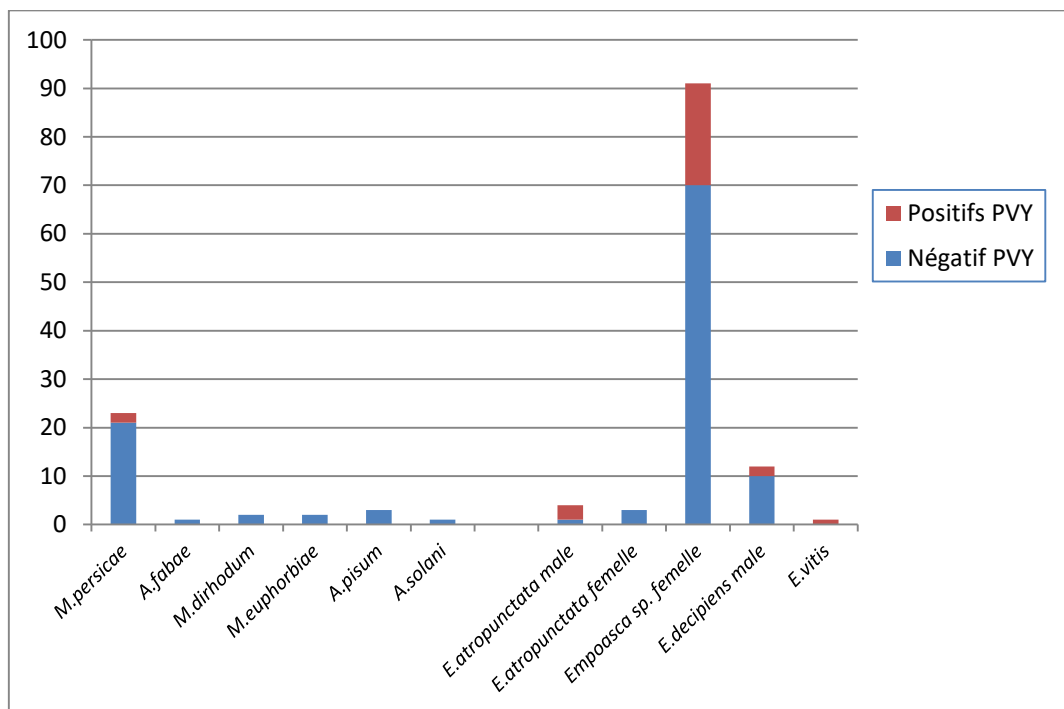


Figure 2 : Effectifs des différentes espèces d'Homoptères porteurs ou non du PVY sur la végétation de pomme de terre à Sully-Flibeaucourt (80) durant la campagne de 2014
 Number of Homoptera species carrying PVY or not on the vegetation of potatoes during the summer 2014 in Sully-Flibeaucourt (80)

L'objectif de l'étude réalisée en 2016 est d'évaluer le risque que représentent les cicadelles dans le développement des épidémies de PVY, à savoir :

1. Déterminer si les cicadelles ont la capacité à transmettre le virus Y chez la pomme de terre *Solanum tuberosum*.
2. Définir quelles espèces de cicadelles appartenant à la sous-famille des Typhlocybae sont capables de transmettre le virus Y.

MATERIEL ET MÉTHODE

MATERIEL BIOLOGIQUE

Insectes

Les cicadelles utilisées lors des expérimentations proviennent toutes de piégeages réalisés dans des parcelles de vitrine variétale ou d'essais en Picardie à l'aide d'un aspirateur de type D-VAC. Suite à l'aspiration, un tri sélectif des cicadelles se fait sur la base de critères macroscopiques à l'aide d'un aspirateur à bouche. Les insectes sont récupérés dans un flacon permettant le transport jusqu'au laboratoire.

Matériel végétal

Les plantes saines sont des boutures de *Solanum tuberosum* variété Bintje âgées de deux semaines et issues de cultures in-vitro fournies par le Comité Nord Plants de Pommes de terre. Les plantes infectées sont issues de bouture de *Solanum tuberosum* variété Bintje inoculées mécaniquement avec du PVY souche NTN. Elles sont maintenues dans un phytotron à une température de 22°C et une photopériode de 16h/8h.

TESTS DE TRANSMISSION

Pour tous les tests, les insectes piégés sont déposés sur les plantes saines ou infectées et maintenus sous un voile insecte proof pour une durée d'une semaine. Ils sont éliminés avec un traitement insecticide Decis Protech® (15 g/L deltaméthrine) à la concentration de 4ml/L. 24h après, chaque spécimen est récupéré dans un eppendorf contenant de l'éthanol à 70 % (v/v) en vue d'une identification à l'espèce. Les plantes sont maintenues en phytotron à une température de 22°C et une photopériode de 16h/8h pendant trois semaines.

Test de transmission en condition de choix

Des plantes saines et des plantes virosées sont placées dans une cage insect-proof en plexiglass. Des cicadelles (entre 10-30 individus selon les captures) sont déposées à l'intérieur de la cage et sont mises en contact des plantes pendant quatre semaines. Le dispositif est maintenu dans un phytotron. Quatre semaines plus tard, les cicadelles sont retirées avec un aspirateur à bouche. Après deux jours, sur chaque plante saine, une feuille portant des traces de piqûres alimentaires est prélevée. Lorsque la feuille du dernier entre-nœud n'est pas piquée, celle-ci est aussi prélevée afin de vérifier si le virus inoculé par les cicadelles s'est propagé de manière systémique dans la plante. Les feuilles sont analysées par RT-PCR afin de vérifier si elles sont infectées par le virus.

Le dispositif permet aux insectes de passer librement d'une plante à une autre sans contrainte physique. Deux répétitions indépendantes sont réalisées, la première comprend 15 plantes saines et deux plantes infectées et la seconde 18 plantes saines et deux plantes infectées.

Test de transmission sur des plantes individuelles

Afin de mettre en évidence si les cicadelles ont la capacité de transmettre le PVY au champs, nous avons procédé à des piégeages dans une parcelle où des pieds de pomme de terre montraient des symptômes caractéristiques d'une infection par le PVY (i.e. plante rabougrie avec des décolorations foliaires de type mosaïques). Les spécimens piégés ont été divisés en deux lots, chaque spécimen du premier lot (52 individus) a subi une détection du virus pour voir s'il était porteur du PVY. Pour connaître le potentiel de transmission du PVY par les cicadelles provenant du champ, chaque individu du second lot (81 individus) est déposé individuellement sur une plante saine à l'aide d'un pinceau et y est maintenu pendant 7 jours sous un voile. Les plantes sont conservées au phytotron pendant 3 semaines puis la feuille du dernier entre-noeud de chaque plante est analysée par RT-PCR afin de vérifier la présence du virus.

Test de transmission de plante à plante

Afin de vérifier quelles sont les espèces de cicadelles actives dans la transmission du PVY, 30 individus piégés au champ ont été déposés individuellement sous un voile contenant une plante infectée et une plante saine. Après 7 jours, la plante infectée est retirée du voile et chaque individu est récupéré pour l'identification à l'espèce. La feuille du dernier entre noeud de chaque plante saine est analysée quatre semaines après pour y vérifier la présence du virus.

EXTRACTION DE L'ARN VIRAL A PARTIR DE FEUILLES DE POMME DE TERRE

Les feuilles échantillonnées sont broyées à la presse Pollhan pour obtenir un jus. À partir de 100 µl de jus de plante, les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit d'extraction RNeasy® Mini Kit Plant (Qiagen®) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN sont récupérés dans un volume final de 30µl d'eau ultra pure. La qualité et la concentration des ARN sont estimées au NanoDrop (Thermo Scientific®) puis ceux-ci sont stockés à -80°C.

EXTRACTION DE L'ARN VIRAL A PARTIR DE CICADELLES

Chaque cicadelle est déposée individuellement dans un microtube et est broyée en présence de 200 µl de tampon de lyse du kit NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel®) à l'aide d'un petit pilon. Les ARN sont extraits selon le protocole décrit par le fabricant et sont récupérés dans un volume final de 13 µl d'eau ultra pure. La qualité et la concentration des ARN sont estimées au NanoDrop (Thermo Scientific®) puis ceux-ci sont stockés à -80°C.

DETECTION DU VIRUS PAR RT-PCR EN UNE ETAPE

La RT-PCR est réalisée à l'aide du kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). Une seule paire d'amorces, CP sens 5' ACG TCC AAA ATG AGA ATG CC 3' et antisens 5' TGG TGT TCG TGA TGT GAC CT 3' (Singh et al., 1996), est nécessaire pour les réactions de transcription inverse et de PCR. La transcription inverse est réalisée à partir de 300 ng d'ARN pendant 30 minutes à 50°C suivie d'une étape à 95°C pendant 15 minutes. Suivent ensuite 35 cycles à 95°C pendant 30 secondes, à 60°C pendant 30 secondes et à 72°C pendant 1 minute, puis une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits de RT-PCR obtenus sont visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %.

IDENTIFICATION DES SPECIMENS

Suite aux tests de transmission, les spécimens sont récupérés des plantes à l'aide d'un pinceau et sont conservés dans de l'alcool à 70 % (v/v). L'identification s'effectue sous une loupe binoculaire selon différents critères morphologiques suivant deux clés d'identification (R. Biedermann et al, 2009 ; H. Ribaut, 1936). La caractérisation du genre s'effectue à partir de l'observation des nervures des élytres et des ailes, l'identification de l'espèce est réalisée à partir de la dissection des parties génitales (seulement réalisable chez les mâles).

RESULTATS - DISCUSSION

IDENTIFICATION DES INDIVIDUS PIEGES ET COMPORTEMENT DE PIQURE

Les identifications indiquent que le genre *Empoasca* est majoritairement présent (figure 3), il représente près de 60 % des individus identifiés. 82 spécimens du genre *Empoasca* n'ont pu être identifiés à l'espèce car ce sont des femelles. Pour le genre *Eupteryx*, c'est l'espèce *E. atropunctata* qui est seule présente avec 65 spécimens. Enfin, le genre *Zyginidia* est très faiblement présent dans les captures avec 2 spécimens identifiés. Les individus qui n'ont pas été retrouvés après l'expérimentation ou qui sont trop dégradés sont classés comme non identifiables.

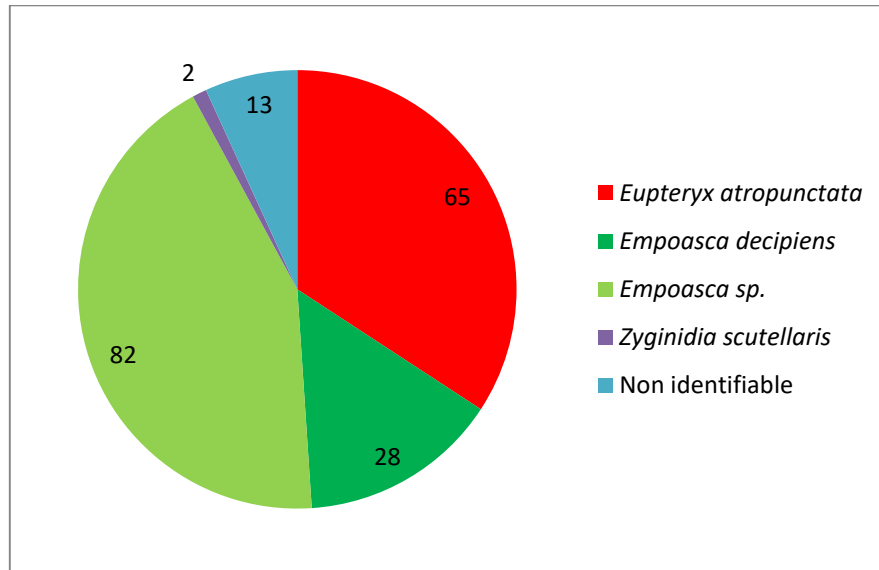


Figure 3 : Effectifs des espèces de cicadelles Typhlocybinae capturées et identifiées lors de la campagne de piégeage de l'année 2016 (total des effectifs des captures)
Identification of Typhlocybinae leafhoppers specimen trapped on potato field during the summer 2016 trapping (total catch)

TEST DE TRANSMISSION EN CONDITION DE CHOIX

Pour la première répétition, sur les quinze feuilles échantillonnées, dix sont positives au PVY. Pour la seconde répétition, après quatre semaines, 15 plantes sur les 18 initiales se sont montrées infectées par le PVY (figure 4). Sur 11 de ces plantes infectées, on détecte le virus autant sur les feuilles piquées qu'au niveau des feuilles apicales, preuve que le virus inoculé par les cicadelles s'est propagé dans la plante.

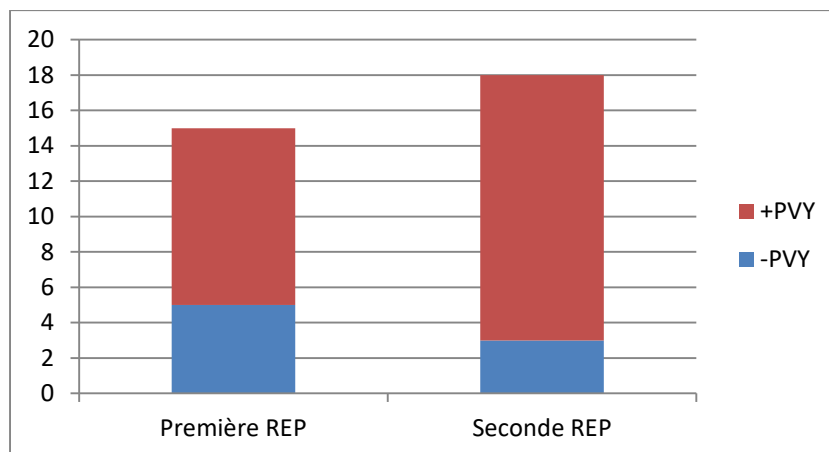


Figure 4 : Résultats de l'électrophorèse sur les feuilles analysées lors du test de transmission en condition de choix.
Results of electrophoresis on the leaves analyzed during the transmission test under choice conditions.

TESTS DE TRANSMISSION SUR PLANTES INDIVIDUELLES

Les cicadelles piégées sont-elles porteuses du PVY ?

La RT-PCR montre une amplification d'une bande de 500 pb indiquant la présence du PVY dans les individus 6, 12, 15 et 17 ; les bandes sont de moindre intensité dans les individus 4, 7 et 8. Sur un total de 52 individus analysés, 9 contenaient le virus, ce qui correspond à un taux d'individu porteurs de 17 %. Les cicadelles présentes au champs sont donc bien porteuses du Virus Y.

Les cicadelles piégées sont-elles capables de transmettre le PVY ?

Sur les 81 plantes testées, 17 ont présenté des traces de piqûres, prouvant l'observation d'alimentation par la cicadelle. Parmi celles-ci, 4 ont présenté un résultat positif à la présence du PVY ce qui correspond à un taux de transmission de 5 %. Les cicadelles peuvent donc bien transmettre le Virus Y à la fois en conditions contrôlées mais aussi à partir de spécimens capturés au champs.

TEST DE TRANSMISSION DE PLANTE A PLANTE

30 cicadelles prélevées au champs sont posées sur 30 plantes saines individuelles. Sur les 30 plantes analysées, 6 sont testées positives au Virus Y, ce qui indique un pourcentage de transmission de 20 %. Parmi ces transmissions, à la fois les espèces *Eupteryx atropunctata* et *Empoasca decipiens* sont concernées. Au vu des faibles effectifs testés lors de cette expérimentation, la proportion des espèces vectrices ne peut pas être estimée précisément. Cependant sur le total des 190 spécimens testés sur toutes les expérimentations qui ont en grande partie pu être identifiés, un histogramme des proportions d'espèces responsables des transmissions peut être retracé ci-dessous (figure 5). On peut noter que le genre *Eupteryx* semble être un meilleur vecteur que le genre *Empoasca*. Cette observation est à confirmer par de futures expérimentations.

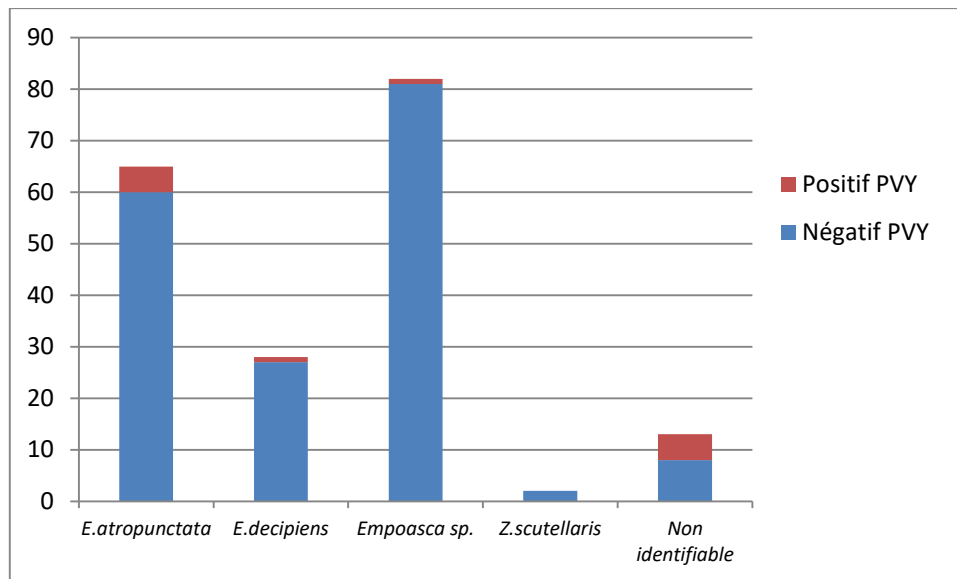


Figure 5 : Effectifs des cicadelles identifiées dans les expérimentations et responsables des transmissions du PVY
 Identification of the species of leafhoppers used in experiments and responsible for transmissions of PVY

CONCLUSION

Ces travaux mettent pour la première fois en évidence que les cicadelles de la sous-famille des Typhlocybiinae peuvent être porteuses du Virus Y de la pomme de terre et avoir la capacité de le transmettre. Le virus inoculé se propage ensuite dans la plante de manière systémique.

Dans la parcelle infectée, nous avons mis en évidence que 17 % des cicadelles échantillonnées étaient porteuses du virus. Compte tenu de la mobilité importante des cicadelles d'une plante à l'autre cela peut représenter un risque important pour la propagation du virus. Cependant, à lui seul, ce résultat ne reflète pas le risque réel de transmission puisque nous avons analysé le contenu total des cicadelles (comprenant le contenu du tube digestif). Le transfert des cicadelles provenant de plantes symptomatiques en parcelle vers des plantes saines a révélé un taux de transmission avéré de 5 %. Ce faible taux de transmission en comparaison avec le taux de détection analysé dans les spécimens, peut-être dû à une perte de la rétention du virus pendant le transfert des cicadelles depuis le lieu de capture vers le laboratoire.

Il est à noter que les effectifs de cicadelles sont croissants entre juin et juillet, ces pics de population coïncident avec la période végétative de la pomme de terre et peut constituer un risque de transmission et de propagation du virus.

Nous avons mis en évidence que les deux espèces *Eupteryx atropunctata* et *Empoasca decipiens* sont actives dans la transmission du PVY. Les tests ont parfois été positifs au virus (preuve de transmission) avant même l'apparition de piqûres alimentaires.

En effet, sur un total de 190 individus, seuls 18 % des cicadelles utilisées lors des tests ont piqué les plantes sur lesquelles elles ont été déposées prouvant une alimentation active. Cette valeur est répartie entre les genres *Empoasca* et *Eupteryx* responsables respectivement de 10 % et 8 % des piqûres observées, ce qui ne met pas en évidence un avantage dans le comportement de piqûre entre ces deux genres.

De nombreuses questions restent en suspens quant aux paramètres de cette transmission telle qu'elle s'effectue au champs. Il reste à préciser si le virus peut être acquis de la même manière à tous les stades de développement ou pour les 2 sexes de la cicadelle. Il reste également à préciser les

modalités de la transmission (temps d'acquisition, temps d'inoculation du virus). De la même manière que chez le puceron, existe-t-il un mécanisme d'accrochage du virus chez la cicadelle ? Il reste également à préciser les éléments de biologie de la cicadelle sur la pomme de terre selon les différentes espèces retrouvées (comportement alimentaire, capacités de reproduction et paramètres reproductifs, phénomènes de flux migratoires, autres espèces végétales hôtes...)

La mise en place d'un élevage devrait nous aider à répondre à ces interrogations et à améliorer le ou les futurs dispositifs expérimentaux.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des équipes de la SIPRE et de la FREDON de Picardie qui nous ont aidés à réaliser cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

Biedermann.R, Niedringhaus.R (2009) - The Plant-And Leafhoppers of Germany. Identification key to all species.

Blanchard A., Rolland M., Lacroix, C., Kerlan C., Jacquot E. (2007) - Potato virus Y: a century of evolution. *Virology*, 7.

Foissac X., Wilson M.R. (2010) - Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In: Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes. Plant hosts and vectors*, CABI. Wallingford, pp 309–324.

Nakashima, K. & Murata, N. (1993) - Destructive plant diseases caused by mycoplasma-like organisms in Asia. *Outlook Agric*, 22, 53–58.

Pelletier, Y., Nie, X., Giguère, M., Nanayakkara, U., Maw, E. and Footitt, R. (2012) - A New Approach for the Identification of Aphid Vectors (Hemiptera: Aphididae) of Potato Virus Y. *jnl. econ. entom.*, 105, 1909-1914.

Ribaut. H (1935) - Faune de France n°31 : Homoptères Auchénorhynques I, Typhlocybidae.

Tjallingii, W.F. and Esch, T. (1993) - Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, 18, 317-328.

Van Hoof, H.A. (1980) - Aphid vectors of potato virus YN. *Neth. J. Pl. Path.*, 86: 159.