

ANALYSE DES INTERACTIONS VIRUS-PUCERONS-PLANTES IMPLIQUEES DANS L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES JAUNISSES SUR GRANDES CULTURES

M. Souquet^{1,2}, E. Pichon^{1,2}, T. Armand¹, A. Pinault¹, Q. Le Blaye¹, S. Dallot^{1,2}, G. Thébaud^{1,2} et E. Jacquot^{1,2}

¹ BGPI, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Cirad TA A-54/K, Campus international de Baillarguet, 34398, Montpellier, France

² Projet « ABCD-B de la protection contre les viroses transmises par les pucerons : Biocontrôle et variétés », Ecophyto II

RÉSUMÉ

Depuis de nombreuses années, les méthodes de lutte contre les viroses transmises par pucerons sur grandes cultures étaient principalement basées sur l'utilisation de solutions phytosanitaires à base de néonicotinoïdes. Le retrait de cette famille chimique par l'Union Européenne à l'automne 2018 et l'absence de nouvelles solutions a relancé l'intérêt de la communauté scientifique pour la caractérisation de solutions alternatives impliquant entre autres des ressources génétiques. Ainsi, une gamme de génotypes de blé, de colza et de betterave a été testée en conditions contrôlées à l'aide d'un ensemble de dispositifs expérimentaux afin d'évaluer le potentiel de ce matériel génétique pour la lutte contre l'infection virale. Plusieurs paramètres épidémiologiques ont ainsi été estimés pour chaque pathosystème : taux d'infection, qualité hôte pour la production (antibiose) et le maintien (antixénose) de populations de pucerons, et durée de latence lors de l'infection virale. Les données produites par cette étude mettent en évidence les étapes du cycle infectieux pouvant constituer une cible pour la mise en place de nouvelles stratégies de lutte dans un environnement agricole sans néonicotinoïdes.

Mots-clés : Jaunisse virale, colza, céréales, betterave, pucerons

Introduction

La protection des cultures contre les maladies virales transmises par vecteurs aériens repose sur des stratégies impliquant des pratiques adaptées (optimisation des dates de semis, gestion des repousses...), l'utilisation de ressources génétiques (variétés tolérantes et résistantes aux virus) et/ou l'application de produits phytosanitaires (insecticides) ou de bio-contrôle (huiles minérales, extraits de plantes, micro-organismes...). Pour ce qui concerne la gestion des jaunisses virales sur céréales (jaunisse nanisante de l'orge (JNO), D'Arcy and Burnett, 1995), sur colza (jaunisse du colza (JC), Stevens et al., 2005) et sur betterave (jaunisse de la betterave (JB), Hauser et al., 2000) – trois viroses transmises par pucerons selon le mode persistant (Brault et al., 2010) – l'absence de variété résistante et la faible efficacité des pratiques culturales ont conduit les agriculteurs à privilégier l'utilisation de stratégies chimiques (insecticides) pour limiter l'incidence de ces maladies sur leurs cultures. Aussi, depuis plus de vingt ans, l'application d'insecticides à base de néonicotinoïdes (NNI) constituent un des principaux moyens de lutte contre ces jaunisses avec en France près de 20%, 80%, 25% et 98% des surfaces cultivées de blé, d'orge, de colza et de betterave traitées par ces matières actives (Mc Namara et al., 2020 ; Hauer, 2016 ; ANSES, 2018). Cependant, dès 2013, la Commission Européenne a restreint l'utilisation de cette famille d'insecticides en interdisant son utilisation dans les cultures attirant les abeilles, avec des exceptions pour l'utilisation en serre, le traitement de certaines cultures après la floraison et pour les céréales d'hiver. L'utilisation en plein champ de NNI sur blé, colza et betterave a été interdite à partir de l'automne 2018 (EFSA, 2018), ce qui a potentiellement augmenté l'exposition de ces cultures aux insectes et aux virus qu'ils transmettent (Rivero, 2010). Dans le contexte d'une agriculture sans NNI, il convient donc de réinvestir dans l'étude du cycle épidémiologique des maladies virales telles que les jaunisses des grandes

cultures, afin d'identifier de nouveaux leviers sur lesquels il serait possible d'agir pour maintenir, voire améliorer, la protection des plantes.

Aussi, en s'appuyant sur les connaissances académiques relatives aux pathosystèmes de la JNO, de la JC et de la JB, différentes étapes clés du processus épidémique reposant sur des interactions virus-hôte (taux d'infection, accumulation virale et durée de la latence) et vecteur-hôte (antibiose et antixénose) ont été identifiées comme cibles pour évaluer le potentiel d'une gamme de génotypes de blé, de colza et de betterave dans la lutte contre l'infection virale et sa propagation dans le compartiment cultivé. A l'aide de dispositifs expérimentaux adaptés, ces paramètres épidémiologiques ont été estimés et seront utilisés pour déterminer si, et comment, certains de ces génotypes peuvent participer aux futures stratégies de lutte contre les jaunisses virales transmises selon le mode persistant par pucerons, dans une agriculture sans néonicotinoïdes.

Matériels et méthodes

Plantes, insectes et virus

Des génotypes de blé (v1 à v11, dont v10 comme génotype sensible de référence), de colza (DK Exception (génotype sensible de référence), Architect et RGT Quizz) et de betterave (VY0 à VY10 dont VY0 comme génotype sensible de référence) ont été utilisés pour évaluer la résistance de ce matériel aux jaunisses virales.

Les clones *Rhopalosiphum padi* RplA (collecté dans le département de l'Yonne en 2012) et *Myzus persicae* Mp34 (Labonne et al., 1995) ont été utilisés pour réaliser les transmissions virales. Des élevages de RplA et de Mp34 sont maintenus en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C, RH : 40%) dans des mini-cages en plexiglass en présence de plantes saines de blé cv. v10 (pour RplA), de colza cv. DK Exception (pour Mp34) et de betterave cv. VY0 (pour Mp34).

Les isolats PAV4 du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV-PAV4 ; Chain et al., 2007), PS du virus de la jaunisse du colza (TuYV-PS ; isolé par E. Pichon et M. Souquet à partir de feuilles infectées collectées dans le département de l'Ain en 2018) et itb2 du virus de la jaunisse modérée de la betterave (BMVYV-itb2 ; Hauser et al., 2000) ont été maintenus en présence de pucerons (RplA pour BYDV-PAV4, Mp34 pour TuYV-PS et BMVYV-itb2) sur blé (cv. v10), colza (cv. DK exception) et betterave (cv. VY0), respectivement.

Production du matériel végétal pour les expérimentations

Différentes conditions de production de plantes ont été appliquées en fonction de l'espèce végétale et de l'expérimentation. Ainsi, le blé a été semé en substrat neutre (vermiculite) dans des tubes en plastique (2 cm de diamètre et 8 cm de long). Après semis, les plantes ont été maintenues en serre (jour/nuit : 12h/12h, 24°C/20°C) pendant 8 jours avant d'être utilisées. Le colza et la betterave ont été semés sur terreau N2 (Neuhaus® Huminsubstrat N2, klasmann Deilmann, Geeste, Germany) en barquettes (Lxlxh : 13.4x12.2x4.9 cm) et maintenus en chambre de culture (jour/nuit : 12h/12h, 23°C/20°C) sous cloche pendant 3 jours. Les plantules de colza et de betterave ont été repiquées 5-7 jours après semis en pots individuels (TEKU® 7x7 cm et 9x9 cm) ou en plaques alvéolées (30 cavités, Lxlxh : 30x25x7 cm) en fonction de la nature et de la durée totale des expérimentations. Après repiquage, les pots et plaques alvéolées ont été placés en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C) pendant 7 jours avant leur utilisation dans les expérimentations.

Evaluation du taux d'infection

Des plantes âgées de 8 (blé), 14 (betterave) et 12 (colza) jours ont été utilisées pour évaluer la sensibilité d'une gamme de génotypes (12 blés, 11 betteraves et 3 colzas) à l'infection virale par pucerons. A l'aide d'un pinceau, 2 pucerons virulifères de stade L₂/L₄ ont été déposés sur chacune des plantes du dispositif. Afin d'assurer le maintien des pucerons sur les plantes pendant la période d'inoculation, un système de confinement individuel, basé sur l'utilisation de sachets en plastique (pour le colza et la betterave) ou de microtubes (pour le blé) a été mis en place sur chacune des plantes test. A la fin de la période d'inoculation (4h pour le blé et la betterave, 2h pour le colza), les pucerons virulifères ont été

retirés manuellement, les plantes ont été traitées à l'aide d'un insecticide (Pirimor® 0.1% v/v, Syngenta®, Bâle, Suisse) et transférées en chambre de culture pour une période de 3 semaines. A la fin de cette période, les plantes ont été échantillonnées et leur statut sanitaire évalué par diagnostic sérologique (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)). L'ensemble du dispositif expérimental a été répliqué au moins 2 fois pour chaque espèce végétale en utilisant des lots de 20 (blé et betterave) ou de 40 (colza) plantes par génotype pour chacune des répétitions.

Evaluation de la fitness de pucerons

Des larves de *R. padi* RplA et de *M. persicae* Mp34 ont été obtenues par une synchronisation de 24h des élevages de pucerons sur blé cv. v10 (RplA), colza cv. DK Exception (Mp34) et betterave cv. VY0 (Mp34). Une larve L₁ a été déposée sur chacune des plantes tests âgées de 8 (blé), 14 (betterave) et 12 (colza) jours. Les plantes ont ensuite été confinées individuellement sous des sachets en plastique micro-perforés et maintenues en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C) pendant 14 (blé), 13 (betterave) et 9 (colza) jours. A la fin de cette période, le nombre de pucerons présents sur chaque plante a été compté. Ce dispositif expérimental a été répliqué 3 fois pour chaque espèce végétale en utilisant des lots de 10 (blé et betterave) et 20 (colza) plantes pour chacune des répétitions.

Estimation de la dispersion virale

Un puceron virulifère Mp34/TuYV-PS de stade L₃/L₄ a été déposé au centre d'un dispositif constitué par une plaque alvéolée (30 cavités) présentant des plantules de colza (1 plantule par cavité). Ce dispositif a été maintenu en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C) pendant 14 jours. A la fin de cette période, le nombre de pucerons par plante a été compté avant d'appliquer un traitement insecticide (Pirimor® 0,1% v/v) à l'ensemble du dispositif. Les plantes ont été maintenues en chambre de culture pendant 3 semaines, puis leur statut sanitaire a été évalué par ELISA. Ce dispositif expérimental a été répliqué 4 fois.

Estimation de la durée de latence

Des pucerons virulifères Mp34/TuYV-PS de stade L₂/L₄ ont été déposés (5 pucerons/plante) pendant 24h sur des plantes (n=40 par génotype) de colza (cv. RGT Quizz, cv. DK Exception, cv. Architect) âgées de 12 jours. A la fin de cette période d'inoculation, les pucerons ont été retirés manuellement. A 5 dates après inoculation (3, 7, 10, 14 et 21 jours), des pucerons Mp34 sains de stade L₁/L₄ ont été confinés pendant 24h sous des sachets en plastique sur 8 plantes précédemment inoculées et potentiellement sources de virus. Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'sources' pour le dispositif expérimental. A la fin de cette période d'acquisition, les pucerons issus de chacune de ces plantes 'sources' ont été transférés sur 10 plantes de colza cv. DK Exception saines âgées de 12 jours (2 pucerons/plante). Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'tests' pour le dispositif expérimental. Les plantes 'tests' ont été confinées en présence des pucerons vecteurs sous des sachets en plastique pendant 24h avant d'être traitées au Pirimor® (0,1% v/v). L'ensemble des plantes 'tests' et les plantes 'sources' ont été maintenues en chambre de culture pendant 3 semaines après inoculation des plantes 'tests', puis leur statut sanitaire a été testé par ELISA (plantes 'tests') ou par RT-PCR (plantes 'sources'). L'ensemble du dispositif expérimental a été répliqué 3 fois.

Caractérisation du statut sanitaire des échantillons

Les plantes échantillonnées pour la réalisation de diagnostics ELISA (Clark et Adams, 1977), ont été broyées à l'aide d'une presse Pöhlane (MEKU®, Wennigsen, Allemagne). Pour les feuilles de blé, ce broyage a été réalisé en présence de 400 µL de tampon de broyage (PBST (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 12H₂O, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,05% (v/v) Tween 20), 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone 40T). Le matériel végétal échantillonné pour la réalisation de diagnostics moléculaires (RT-PCR) a été conditionné dans des microtubes stériles contenant 1 bille métallique (4 mm de diamètre) puis broyés à froid en présence d'azote liquide, à l'aide du broyeur MM301 (Retsch, Hann, Germany).

Pour le test ELISA, les puits d'une plaque de microtitration (NUNC, Maxisorp) ont été incubés à 37°C pendant 4h (TuYV) et 3h (BYDV et BMVYV) en présence d'anticorps polyclonaux (TuYV (LOEWE®,

Sauerlach, Germany), BYDV-PAV (PAV52, H. Lapiere, INRA), BMVYV (DSMZ, Braunschweig, Germany)) préalablement dilués (TuYV : 1/400 ; BYDV-PAV et BMVYV : 1/1000) dans du tampon carbonate (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH=9,6). Entre chaque étape, les plaques ont été lavées 3 fois avec du tampon PBST. Pour la détection du BMVYV, les puits ont été saturés (30 min à 37°C) par du tampon PBST supplémenté par du lait écrémé 2% (w/v) avant le dépôt des échantillons. Cent µl de jus brut ont été déposés dans les puits et incubés une nuit à 4°C. Un anticorps couplé à la phosphatase alcaline (@-PA) dilué (TuYV : 1/400 ; BYDV-PAV et BMVYV : 1/1000) dans du tampon conjugué (tampon PBST, 2% (w/v) d'ovalbumine) a été déposé et incubé 4h (TuYV), 3h (BYDV-PAV) et 1h (BMVYV) à 37°C. Pour la détection du BMVYV, une étape supplémentaire consistant à incubé pendant 3h la plaque en présence d'un anticorps secondaire dilué à 1/1000 dans du tampon conjugué a été réalisée avant l'ajout de l'anticorps @-PA. Après un dernier lavage, 100 µL de diéthanolamine (1N, pH=9,8) contenant du p-nitrophenylphosphate (1 mg/mL) ont été déposés dans les puits de la plaque. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité (2h (TuYV et BYDV-PAV) et 1h (BMVYV)), les densités optiques ont été mesurées à 405 nm (DO₄₀₅) à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan™ FC ; Thermo Scientific™). Le seuil de positivité du test a été fixé à deux fois la valeur de DO₄₀₅ des témoins sains avec une valeur minimale de DO₄₀₅=0,1. Des gammes de dilution en série ont été réalisées à partir de fractions semi-purifiées de BMVYV-itb2 (391 ng/µL) et de BYDV-PAV4 (223 ng/µL). Les fractions diluées obtenues ont été utilisées lors des analyses sérologiques, conjointement aux échantillons à tester, de manière à pouvoir comparer les charges virales des échantillons.

Les ARN totaux de colza obtenus par broyage en microtubes ont été extraits à l'aide du kit Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs®, Ipswich, Massachusetts, USA). La présence de TuYV dans ces échantillons a été testée à l'aide du kit One taq® One-step RT-PCR (New England Biolabs®) selon les recommandations du fournisseur, une température d'élongation de 55°C et les amorces CPBM+ (5'-atgaatagctgtcgtaggag-3') et CPBM- (5'-ccagctatcgatgaagaaccattg-3') (Hauser et al., 2000). Après amplification de l'acide nucléique viral présent dans 1 µL d'extrait d'ARN total, 5 µL du mélange réactionnel ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% w/v). Les amplifiats ont été révélés en présence de bromure d'éthidium grâce à un transilluminateur sous lumière UV.

Analyses statistiques

Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2020) via des tests de Kruskal-Wallis (charge virale) et des modèles linéaires généralisés (taux d'infection et fitness des pucerons).

Résultats

Taux d'infection et accumulation virale

Le niveau de sensibilité de plusieurs génotypes de blé, de colza et de betterave a été évalué à l'aide de protocoles d'inoculation standardisés permettant d'obtenir des taux d'infection de 68% (+/-4%) pour le blé cv. v10, 64% (+/-3%) pour le colza cv. DK Exception et 25% (+/-15%) pour la betterave cv. VY0, génotypes sensibles de référence utilisés pour chaque espèce vis-à-vis de son virus respectif (Fig. 1A).

Pour les pathosystèmes blé/RpIA/BYDV-PAV4 et betterave/Mp34/BMVYV-itb2, la mesure du taux d'infection relatif (r_{inf} = taux d'infection du génotype testé / taux d'infection du génotype de référence) varie de 0,80 à 1,05 pour les génotypes de blé et de 1,0 à 1,7 pour les génotypes de betterave (Fig. 1B). L'analyse des taux d'infection relatifs obtenus pour le blé ($p=0,40$) et la betterave ($p=0,69$) ne montre pas de différence significative entre les différents génotypes testés et le génotype de référence. L'analyse des données associées aux génotypes de colza montre pour le génotype Architect ($r_{inf}=0,39$, $p=3,2\times 10^{-9}$) un taux d'infection significativement plus faible que le génotype DK Exception et pour le génotype RGT Quizz ($r_{inf}=0,91$, $p=0,354$) un taux d'infection semblable au génotype de référence.

L'utilisation de gammes de dilutions réalisées à partir de fractions semi-purifiées de BYDV-PAV4 et de BMVYV-itb2 a permis d'estimer par ELISA semi-quantitatif la charge virale des plantes de blé et de betterave infectées (Fig. 2). Pour le blé, les génotypes v4 ($r_{conc}=0,60$, $p=5,5\times 10^{-3}$), v7 ($r_{conc}=0,41$, $p=7,3\times 10^{-7}$) et v11 ($r_{conc}=0,57$, $p=9,3\times 10^{-4}$) présentent une charge virale significativement plus faible que la référence

sensible v10 alors que le génotype v12 ($r_{\text{conc}}=1,27$, $p=3,1\times 10^{-2}$) accumule plus fortement le virus que le génotype v10. Les autres génotypes testés ne montrent pas une accumulation virale significativement différente du référent. Pour la betterave, seul le génotype VY10 ($r_{\text{conc}}=1,55$, $p=4\times 10^{-3}$) présente une accumulation virale significativement plus élevée que le génotype de référence VY0 (Fig. 2).

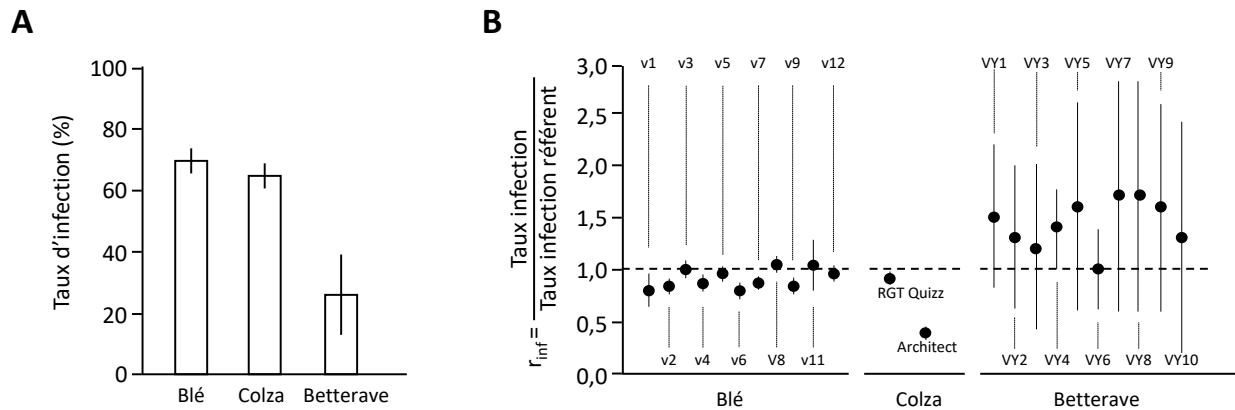


Figure 1. Taux d'infections obtenus lors de l'inoculation de génotypes de blé, de colza et de betterave de référence (A) et taux d'infections relatifs (r_{inf}) associés aux génotypes tests (B). Des séries de 20 (blé et betterave) ou de 40 (colza) plantes ont été inoculées à l'aide de pucerons virulifères selon un protocole d'inoculation standardisé. Trois semaines après retrait des pucerons vecteurs, le statut sanitaire des plantes a été testé par ELISA. Taux moyens d'infection observés pour les génotypes de référence cv. v10 (blé), cv. DK Exception (colza) et cv. VY0 (betterave) (A). Taux d'infection obtenus pour les génotypes tests (cv. v1 à v9, cv. v11 et cv. v12 pour le blé ; cv. Architect et cv. RGT Quizz pour le colza ; cv. VY1 à VY10 pour la betterave), exprimés relativement au taux d'infection du génotype de référence (r_{inf}) (B). Les barres verticales représentent les écarts-types des données.

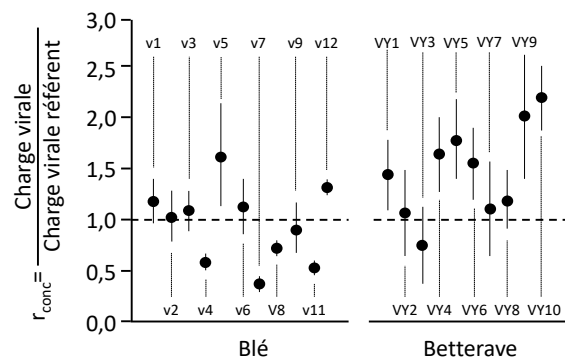


Figure 2. Charge virale relative (r_{conc}) associée aux génotypes tests. Des séries de 20 plantes ont été inoculées par des pucerons virulifères selon un protocole d'inoculation standardisé. Trois semaines après retrait des pucerons vecteurs, la charge virale présente dans les plantes a été estimée par ELISA semi-quantitatif en utilisant des gammes de virus purifiés (isolats BYDV-PAV4 et BMVYV-itb2). Les charges virales obtenues pour les génotypes testés (cv. v1 à v9, cv. v11 et cv. v12 pour le blé, et cv. VY1 à VY10 pour la betterave) ont été normalisées (r_{conc}) par rapport à la charge virale présente dans les plantes infectées des génotypes de référence cv. v10 (blé) et cv. VY0 (betterave). Les barres verticales représentent les écarts-types des données.

Fitness des pucerons

Le nombre de descendants produits à partir d'un puceron aptère non virulifère permet d'accéder à des informations relatives au comportement de cet insecte. Ainsi, ce paramètre a été mesuré pour le clone Mp34 de *M. persicae* sur colza (cv. DK Exception) et sur betterave (cv. VY0), et pour le clone RpIA de *R. padi* sur blé (cv. v10). Dans les conditions expérimentales utilisées, le génotype de référence pour chaque espèce végétale permet d'obtenir à partir d'une larve L₁ fondatrice, 18 (+/-1,6) pucerons pour le blé, 19 (+/-1,1) pour le colza et 14 (+/-2,4) pour la betterave (Fig. 3A).

L'analyse des données associées aux génotypes de blé montre une diminution globale du nombre de pucerons produits pour les différents génotypes testés (Fig. 3B) et une diminution significative de ce paramètre pour les génotypes v1 ($r_{\text{fit}}=0,52$, $p=2,2\times 10^{-5}$) et v11 ($r_{\text{fit}}=0,53$, $p=4,4\times 10^{-5}$). Sur colza, le nombre de pucerons *M. persicae* produits à partir de l'individu fondateur n'est pas significativement différent entre les génotypes ($p=0,2$). Enfin, pour les génotypes de betterave VY2 ($r_{\text{fit}}=1,47$, $p=0,065$), VY6 ($r_{\text{fit}}=1,52$,

$p=4\times 10^{-2}$) et VY10 ($r_{\text{fit}}=1,64$, $p=1,4\times 10^{-2}$), les pucerons sont significativement plus nombreux que sur le référent VY0, suggérant de porter une attention particulière à ces 3 génotypes quant à leur impact sur l'abondance du puceron *M. persicae*. Seul le génotype VY4 ($r_{\text{fit}}=0,65$, $p=0,089$) présente une légère tendance à réduire le nombre de puceron produit à partir de l'individu fondateur.

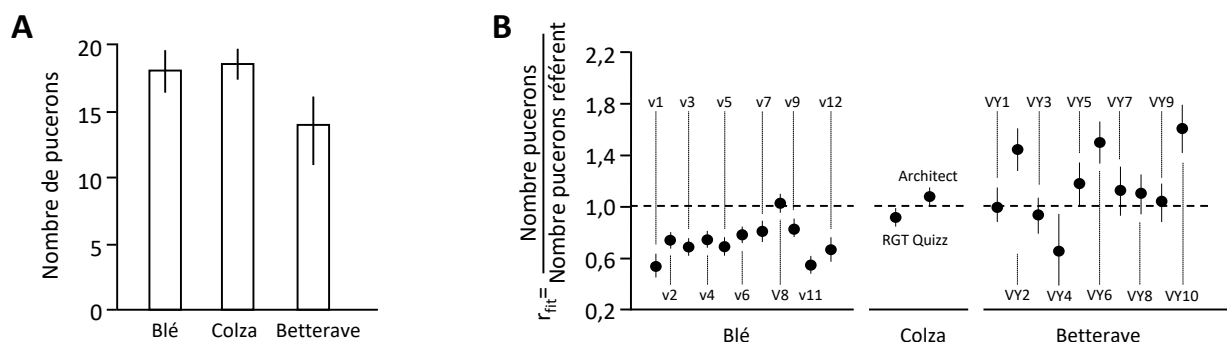


Figure 3. Nombre de pucerons produits par une larve L₁ fondatrice sur différents génotypes de référence (A) et sur génotypes tests (B). Des larves de pucerons (L₁) âgées de 1 jour ont été utilisées comme individus fondateurs et placées sur des plantes (10 pour le blé et la betterave, 20 pour le colza) afin de mesurer la taille de la population produite après 14 (blé), 13 (betterave) et 9 (colza) jours. Tailles moyennes des populations obtenues pour les génotypes de référence cv. v10 (blé), cv. DK Exception (colza) et cv. VY0 (betterave) (A). Nombre d'individus observés en fin d'expérimentation pour les génotypes tests (cv. v1 à v9, cv. v11 et cv. v12 pour le blé ; cv. Architect et cv. RGT Quizz pour le colza ; cv. VY1 à VY10 pour la betterave), exprimé relativement (r_{fit}) au nombre de pucerons observés sur le génotype de référence (B). Les barres verticales représentent les écarts-types des données.

Dispersion virale

Une estimation de la dispersion des pucerons et du virus qu'ils transmettent a été réalisée pour les trois génotypes de colza étudiés. Après 14 jours de présence dans le dispositif, le puceron fondateur (apporté au stade L₃/L₄) et sa descendance ont colonisé environ la moitié des plantes disponibles (de 48% à 55%) avec en moyenne de 7.6 à 12.7 individus par plante selon les génotypes de colza étudiés (Tableau 1, colonnes ^a et ^b). Les différences mesurées entre les trois génotypes testés sont significatives pour la capacité de *M. persicae* à coloniser les plantes du dispositif ($p=1,1\times 10^{-2}$). Toutefois, le nombre d'individus produit par plante colonisée est comparable entre les génotypes testés ($p=0,501$). Ces résultats suggèrent que le clone de *M. persicae* utilisé ne se comporte pas de la même manière sur ce matériel biologique quant à sa mobilité (antixénose) alors que sa capacité à passer du stade L₁ au stade adulte et à produire de nouvelles larves sur les plantes colonisées (antibiose) est équivalente sur ces trois génotypes.

Le statut virulifère du puceron apporté au début de l'expérience permet de compléter l'observation de la colonisation des plantes par une analyse de l'état sanitaire de ces dernières. Les taux de transmission calculés pour l'ensemble des plantes du dispositif (Tableau 1, colonne ^c) et pour les seules plantes colonisées par au moins un puceron (Tableau 1, colonne ^d) illustrent la bonne installation du virus dans le dispositif expérimental pour les génotypes DK Exception et RGT Quizz pour lesquels plus de 35% de l'ensemble des plantes du dispositif et plus de 60% des plantes colonisées par au moins un puceron ont été infectées. Pour le génotype Architect, le taux d'infection se limite à 4.8% des plantes colonisées, ce qui suggère que la pression imposée pendant 14 jours par le puceron virulifère et sa descendance aux plantes Architect colonisées n'a pas permis une installation efficace du virus dans le dispositif expérimental.

L'observation de plantes colonisées au temps défini par la fin de l'expérimentation ne représente qu'une donnée ponctuelle des événements ayant eu lieu entre l'apport du puceron fondateur et l'observation de chacune des plantes du dispositif. Aussi, des plantes non colonisées au 14^{ème} jour de l'expérience ont pu être visitées par un puceron virulifère sans que ce dernier n'y établisse de colonie. En effet, environ 15% des plantes non colonisées ont été infectées (Tableau 1, colonne ^e) pour les génotypes DK Exception (10/67) et RGT Quizz (19/112), indiquant la présence temporaire (et l'alimentation) de pucerons virulifères sur ces plantes au cours de l'expérimentation. Toutefois, aucune des 59 plantes de cv. Architect non colonisées n'a été infectée.

Tableau 1. Efficacité de colonisation d'un dispositif multi-plantes par un puceron virulifère

Génotype	Colonisation du dispositif (%) ^a	Puceron/plante ^b	Transmission (%)		
			Par dispositif ^c	Par plante colonisée ^d	Par plante non colonisée ^e
DK Exception	48,0 (+/-6,3)	12,7 (+/-2,0)	35,8 (+/-3,2)	62,9 (+/-4,2)	14,9 (10/67)
RGT Quizz	49,1 (+/-3,9)	9,1 (+/-0,5)	42,4 (+/-2,6)	65,7 (+/-1,7)	17,0 (19/112)
Architect	54,7 (+/-6,1)	7,6 (+/-0,7)	3,0 (+/-0,5)	4,8 (+/-0,9)	0,0 (0/59)

^a: pourcentage de plantes colonisées par au moins un puceron à la fin de l'expérimentation (i.e. 14 jours après apport du puceron virulifère initial)

^b: nombre calculé à partir des plantes colonisées par au moins un puceron à la fin de l'expérimentation

^c: taux de transmission calculé sur la base du nombre total de plantes dans le dispositif expérimental (i.e. 30 plantes)

^d: taux de transmission calculé en considérant uniquement les plantes colonisées par au moins un puceron en fin d'expérimentation

^e: pourcentage calculé en regroupant l'ensemble des plantes non colonisées des différentes répétitions pour chaque génotype

Les données ^a, ^b, ^c et ^d sont présentées en pourcentage (+/- erreur standard). Les données ^e sont présentées en pourcentage (nombre de plantes infectées/nombre de plantes non colonisées sur l'ensemble des dispositifs)

Durée de latence

La mesure du taux d'infection de plantes tests inoculées en utilisant comme source de virus des plantes dont i) le statut sanitaire 'infecté' est validé et ii) la période d'infection varie de quelques jours à plusieurs semaines permet d'accéder à des éléments importants de la dynamique de sortie de latence associée au modèle hôte/virus testé. Dans le cadre de l'étude du pathosystème colza/*M. persicae*/TuYV, l'ensemble des plantes 'sources' du dispositif a été testé *a posteriori* par RT-PCR (données non illustrées) de manière à conserver uniquement les données associées aux plantes 'sources' infectées. Les taux de transmission obtenus pour le génotype de référence (cv. DK Exception) augmentent de 24,8% (+/-1,1%) à 70,0% (+/-6,3%) entre le 3ème et le 21ème jour après inoculation des plantes 'sources' (Fig. 4).

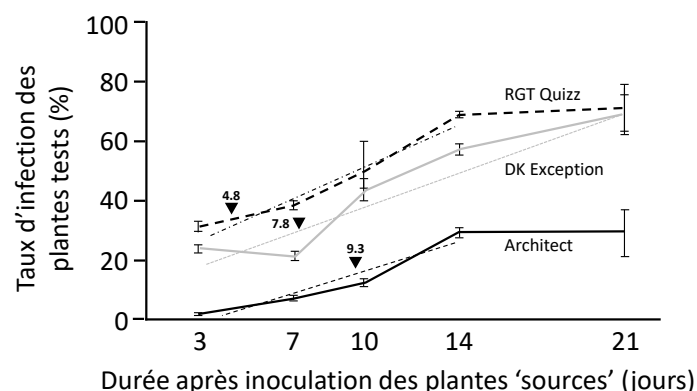


Figure 4. Transmission du TuYV-PS par pucerons à partir de colza 'sources'. Des lots de 8 colzas infectés depuis 3, 7, 10, 14 et 21 jours ont été utilisés comme sources d'inoculum pour la transmission du TuYV-PS par pucerons à des plantes tests sensibles (cv. DK Exception). A partir de chaque plante source (cv. Architect, cv. RGT Quizz et cv. DK Exception), 10 plantes tests (cv. DK Exception) ont été inoculées. Trois semaines après retrait des pucerons vecteurs, le statut sanitaire des plantes tests a été évalué par ELISA. Les droites de régression sont ajustées sur les taux de transmission obtenus à 3, 7 10 et 14 jours (et 21 jours pour cv. DK Exception). Les durées d'infection requises pour assurer 50% du taux maximal de transmission sont interpolées pour chaque génotype (triangle noir sur la droite de régression correspondante). La procédure expérimentale a été répétée 3 fois pour chaque génotype. Les barres verticales représentent les écarts-types des données.

Les taux de transmission obtenus pour le cv. RGT Quizz augmentent de 31,4% (+/-1,3%) à 71,0% (+/-7,7%) pour des plantes 'sources' infectées depuis 3 à 21 jours et sont comparables (J_3 , J_{14} et J_{21}) ou supérieures (J_7 ($p=3,2 \times 10^{-4}$) et J_{14} ($p=1,4 \times 10^{-2}$)) à ceux associées au cv. DK Exception. L'utilisation du cv. Architect comme source virale réduit significativement les taux de transmission (de 1,9% (+/-0,2%) pour J_3 ($p=7,6 \times 10^{-8}$) à 29,3% (+/-7,6%) pour J_{21} tout en conservant une pente de sortie de latence proche de celle observée pour les autres génotypes testés. Enfin, le plateau observé dans les taux de transmission obtenus à partir des plantes 'sources' infectées depuis 14 et 21 jours indique, pour RGT Quizz et Architect, l'existence à partir de J_{14} d'une valeur source maximale (environ 70% pour RGT Quizz et 30% pour Architect). Pour cv. DK Exception, un tel plateau n'a pas été atteint dans la fenêtre d'observation (J_3 à J_{21}). En considérant une progression linéaire de la valeur source des plantes infectées entre le 3^{ème} et le 14^{ème} jours après inoculation pour cv. RGT Quizz et cv. Architect ($R^2=0.96$ et $R^2=0.92$, respectivement) et entre le 3^{ème} et le 21^{ème} jours après inoculation pour cv. DK Exception ($R^2=0.90$), le temps requis pour atteindre un niveau d'infection permettant une transmission équivalente à la moitié de la valeur source maximale observée correspond à 7,8 jours pour cv. DK Exception, 4,8 jours pour cv. RGT Quizz et 9,3 jours pour cv. Architect (Fig. 4).

Discussion

Cette étude des interactions virus-vecteur-hôte, conduite simultanément sur trois pathosystèmes, s'inscrit dans le cadre du projet Ecophyto II « ABCD de la protection contre les viroses transmises par les pucerons : biocontrôle et variétés ». L'objectif de ce projet, dont le terme est prévu pour l'automne 2021, est d'évaluer le potentiel d'une gamme de génotypes et de solutions de biocontrôle pour la lutte contre les jaunisses virales en l'absence de néonicotinoïdes. A ce jour, seule une partie des données relatives à l'évaluation des génotypes de blé, de colza et de betterave ont été obtenues (cf. ci-dessus). Le pathosystème pour lequel les travaux en cours ont produit le plus de données correspond au pathosystème colza/*M. persicae*/TuYV pour lequel les mesures de taux d'infection, d'accumulation virale, d'antibiose, d'antixénose et de latence virale dans l'hôte sont disponibles. L'interprétation qui suit sera donc focalisée sur les résultats associés à ce pathosystème, et laissera temporairement en suspens (dans l'attente de la suite des expérimentations) l'analyse des résultats obtenus sur les deux autres pathosystèmes (i.e. blé/*R. padi*/BYDV et betterave/*M. persicae*/BMV).

La première étape de l'infection d'une parcelle correspond à l'arrivée du virus (infection primaire). Bien que ce paramètre ne représente généralement qu'une petite partie du processus épidémique global dans une parcelle (Lindblad and Sigvald, 2004), ces premières plantes infectées permettent par la suite la propagation de la maladie au sein de la culture (infections secondaires). Le faible niveau de sensibilité du cv. Architect par rapport à la référence cv. DK Exception devrait permettre de réduire d'environ 2,5 fois le succès des infections primaires. En complément de l'arrivée de pucerons virulifères issus de l'environnement (dont la fréquence peut varier dans l'espace et le temps ; Fabre et al., 2003), la propagation de la maladie au sein de la parcelle dépend des dynamiques de populations des pucerons colonisateurs et des sorties de latence des plantes infectées. Si les mesures relatives aux interactions colza/*M. persicae* produites au cours cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence de différentiel d'antibiose (nombre d'individus produits) entre les génotypes de colza testés, elle indique un différentiel d'antixénose : les pucerons coloniseraient plus efficacement (environ 1,14 fois plus) un environnement constitué de plantes Architect qu'un environnement constitué de plantes DK Exception. Cette légère augmentation de la capacité à coloniser les plantes du génotype Architect semble s'accompagner d'un comportement nomade plus faible, comme l'indique l'absence de plantes infectées non colonisées (ces dernières reflétant un déplacement des insectes sans installation sur les plantes visitées).

La dynamique de sortie de latence et la valeur source de la plante infectée diffèrent significativement pour le cv. Architect par rapport aux deux autres génotypes testés. Ainsi, la valeur source maximale d'une plante de colza cv. Architect est réduite d'un facteur proche de 2,3 (comparaison des potentiels maximaux observés à J_{21}) et le délai requis pour atteindre 50% de sa valeur source maximale est allongé de 1,5 à 4,5 jours. Ces variables épidémiologiques influencent directement la vitesse globale de propagation du virus entre les plantes d'une parcelle. Ainsi, bien que *M. persicae* colonise légèrement plus efficacement un ensemble de plantes cv. Architect, ce génotype devrait réduire non seulement le nombre d'infections primaires dans les parcelles à l'automne (taux d'infection plus faible) mais surtout l'extension secondaire des foyers d'infection en parcelle cv. Architect (valeur source plus faible et latence plus longue). Ces propriétés devraient ainsi conduire au maintien d'une plus grande proportion de plantes saines au sein des parcelles, conférant à cv. Architect une forte plus-value dans la lutte contre la jaunisse sur colza par rapport aux variétés sensibles (e.g. cv. DK Exception). Il reste à évaluer i) le comportement de ce génotype face à des pressions virales différant par leur intensité, leur fréquence et leur durée (reflétant les multiples vols de pucerons ailés à l'automne), et ii) la durabilité du phénotype de résistance partielle du cv. Architect face à la diversité génétique du TuYV et à son potentiel adaptatif. Enfin, la préservation des ressources génétiques peut également être optimisée en identifiant des solutions alternatives basées sur la performance de produits de biocontrôle. C'est sur cet axe de recherche que se positionneront également les prochaines étapes du projet ABCD-B.

Bibliographie

- Anses. 2018. Rapport d'appui scientifique et technique Demande n° 2016-SA-0057 - volet impact agricole. Risques et bénéfices relatifs des alternatives aux produits phytopharmaceutiques comportant des néonicotinoïdes. Tome 3 – Rapport d'appui scientifique et technique sur l'impact agricole.
- Brault V., Uzest M., Monsion B., Jacquot E. and Blanc S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biologies*, 333: 524-538.
- Chain F., Riault G., Trotter M. and Jacquot E. 2007. Valuation of the durability of the Barley yellow dwarf virus-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *Eur J Plant Pathol*, 117, 35-43.
- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol*, 34, 475-83.
- D'Arcy C.J. and Burnett P.A. 1995. Barley Yellow Dwarf, 40 years of progress., APS Press, St Paul, 374.
- European Food Safety Authority. 2018. Evaluation of the data on clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for the updated risk assessment to bees for seed treatments and granules in the EU. EFSA Supporting Publications, 15, 1378E.
- Fabre F., Kervarrec C., Mieuze L., Riault G., Vialatte A. and Jacquot E. 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *J Virol Methods*, 110, 51-60.
- Hauer M., Hansen A.L., Manderyck B., Olsson A., Raaijmakers E., Hanse B., Stockfisch N. and Märländer B. 2016. Neonicotinoids in sugar beet cultivation in Central and Northern Europe: Efficacy and environmental impact of neonicotinoid seed treatments and alternative measures. *Crop Prot*, 93, 132–142.
- Hauser S., Stevens M., Mougel C., Smith H.G., Fritsch C., Herrbach E. and Lemaire O. 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. *Phytopathology*, 90, 460–6.
- Labonne G., Yvon M., Quiot J.-B., Avinent L. and Llacer G. 1995. Aphids as potential vectors of Plum pox virus: Comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Hort*, 386, 207-218.
- Lindblad M. and Sigvald R. 2004. Temporal spread of Wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. *Crop Protection*, 23, 229–234.
- Mc Namara L., Gauthier K., Walsh L., Thébaud G., Gaffney M. and Jacquot E. 2020. Management of yellow dwarf disease in Europe in a post-neonicotinoid agriculture. *Pest Manag Sci*, 76, 2276-2285.

Rivero A., Vezilier J., Weill M., Read A.F. and Gandon S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6:e1001000.

Stevens M., Freeman B., Liu H.Y., Herrbach E. and Lemaire O. 2005. Beet poleroviruses: Close friends or distant relatives? *Mol Plant Pathol*, 6, 1–9.