

Master Agrosience Environnement Territoire Paysage et Forêt
Mention Agroécologie

Rapport de stage de Master 2

**Caractérisation du potentiel épidémique des souches PPV-T et
PPV-An du plum pox virus (PPV) sur *Prunus sp.***

Mots clés : accumulation virale, durée d'incubation, épidémie, plum pox virus
surinfection.

Par : **Grâce Promise F. HOUNDAFOCHE**



Enseignante référente :
Stéphanie GIBOT-LECLERC
Enseignante-Chercheuse
Institut Agro Dijon
Bd Petitjean, 21000 Dijon

Maitres de stage :
Sylvie DALLOT
Ingénieure de recherche

Olivier COTTO
Chercheur
INRAE Montpellier
UMR PHIM
CIRAD - Campus de Baillarguet
TA A-120/K

Résumé

Le plum pox virus (PPV), un virus du genre *Potyvirus*, est l'agent causal de la sharka, la maladie virale la plus importante et la plus préjudiciable aux arbres fruitiers à noyau. Le PPV a un génome diversifié avec 10 souches actuellement détectées à l'échelle mondiale. Parmi ces 10 souches, PPV-M est la plus épidémique dans les vergers européens. Les souches PPV-T et PPV-An ont été récemment détectées sur myrobolan (*P. cerasifera*), un prunier sub-spontané, dans le sud des Balkans. L'objectif principal de cette étude était de caractériser le potentiel épidémique de ces deux souches sur deux espèces cultivées, le prunier domestique et le pêcher. Pour ce faire, deux essais ont été mis en place dans des cellules climatiques. Pour le premier, les paramètres épidémiologiques tels que le taux d'infection, la durée d'incubation, l'intensité des symptômes et l'accumulation virale dans les plantes infectées ont été mesurés et comparés à ceux obtenus pour la souche PPV-M. Sur prunier, on ne détecte pas de différence de durée d'incubation entre les trois souches. Sur pêcher, la durée d'incubation de PPV-M est plus courte que celle de PPV-T et PPV-An n'a induit que des infections asymptomatiques. La proportion de plantes infectées par la souche PPV-M était plus élevée que celui de PPV-T et de PPV-An sur les deux espèces hôtes. Les pêchers infectés par PPV-M et PPV-T avaient une charge virale plus élevée que ceux infectés par PPV-An. Le deuxième essai visait à déterminer la capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers déjà infectés par PPV-M, espèce hôte sur laquelle des infections multiples ont été documentées. PPV-T peut surinfecter des pruniers infectés par PPV-M mais le taux de surinfection est réduit par rapport au taux d'infection obtenu sur des plants préalablement sains. L'ensemble de nos résultats permet de conclure que les vergers de pruniers et de pêchers pourraient être infectés par PPV-T et PPV-An, mais le risque qu'elles provoquent des épidémies dans des vergers où PPV-M circule est faible.

Mots-clés : accumulation virale, durée d'incubation, épidémie, plum pox virus surinfection.

Abstract

Plum pox virus (PPV, genus *Potyvirus*) is the causal agent of sharka, the most important and damaging viral disease of stone fruit trees. Currently, 10 strains of PPV are recognized worldwide. Among these 10 strains, PPV-M is the most epidemic in European orchards. Recently, PPV-T and PPV-An strains have been detected on myrobalan (*P. cerasifera*), a subspontaneous plum, in the southern Balkans. The main aim of this study was to characterize the epidemic potential of these two strains on two cultivated species, plum and peach. Two experiments were set up in growth chambers. In the first experiment, epidemiological parameters such as infection rate, incubation time, symptom intensity and viral accumulation in infected plants were measured and compared to PPV-M. No difference in incubation time was detected between the three strains on plum. On peach, PPV-M has a shorter incubation period than PPV-T and PPV-An caused only asymptomatic infections. The infection rate of the PPV-M strain was higher than those of PPV-T and PPV-An on both host species. Peach trees infected with PPV-M and PPV-T had a higher viral load than those infected with PPV-An. The second experiment was designed to determine the ability of the PPV-T strain to superinfect plum plantlets already infected with PPV-M, the only host species on which frequent multiple infections have been documented. Superinfection with PPV-T of PPV-M infected plantlets is possible, but the infection rate is lower than the one obtained on healthy plants. Taken together, our results suggest that plum and peach orchards can be infected by PPV-T and PPV-An, but the risk of them causing epidemics in orchards where PPV-M is present is low.

Keywords : viral accumulation, incubation period, epidemic, plum pox virus superinfection.

Remerciements

Ce stage a bénéficié d'un soutien financier de la part du **GIS Fruits** à qui j'adresse mes vifs remerciements. Ce fût une belle expérience pour moi aussi bien professionnelle que personnelle. Six mois de bonheur, six mois de joie, six mois d'apprentissage et de découverte du monde de la virologie végétale. D'excellents moments passés aux côtés de personnes aimables, bienveillantes et formidables. Je ne saurais citer ici toutes ces personnes qui ont rendu agréable mon séjour au sein de l'UMR PHIM. Je tiens quand même à exprimer particulièrement ma profonde gratitude à :

Ma maitre de stage, **Sylvie Dallot**, merci pour l'encadrement et ta présence à chaque étape de ce stage. Les débuts n'ont pas été facile, mais tu as finalement su aller à mon rythme. Merci pour ton soutien et tes conseils à certains moments difficiles où je devais faire face à plusieurs réalités administratives. Les quelques balades que nous avons eu dans la garrigue de Baillarguet restent de meilleurs souvenirs pour moi.

Mon maître de stage, **Olivier Cotto**, merci à toi également pour ton encadrement, tes conseils pendant les moments de rédaction et les petites astuces pour mieux utiliser le logiciel R. Je suis convaincue que tout ce précieux temps passé à m'expliquer les modèles statistiques m'aideront énormément dans ma prochaine vie de doctorante.

Marie Brevet, ma « *marraine à PHIM* », comme je t'appelle affectueusement. Toi qui m'as initié aux manip de biologie moléculaire, dès le début de mon stage, tu m'as accueilli avec amour et tendresse. Etant toute seule ici à Montpellier, tu as été pour moi plus qu'une technicienne de recherche. Tu as su combler à ta manière le vide en étant une grande sœur, une amie, un soutien infaillible, une épaule sur qui j'ai versé secrètement mes larmes quand il le fallait. Merci pour ta patience et ta confiance en moi lors des manip où parfois je mettais du temps à bien comprendre les méthodes (surtout les calculs de dilutions,...). Le cahier, les « *astuces de Marie* » regorge aujourd'hui de pleins d'astuces qui me seront toujours utiles et qui à chaque occasion me feront penser à toi. Je souhaite pleins de succès et de bonnes grâces à la merveilleuse personne que tu es.

Mon enseignante référente à l'Institut agro Dijon, **Stéphanie Gibot-Leclerc**. Merci pour tes encouragements depuis ma première année de master, ta disponibilité à m'écouter, tes conseils et astuces pour décrocher une opportunité de thèse et ta grande confiance en l'étudiante que je suis. Je n'oublie pas également ton précieux temps consacré à la relecture de mon rapport quand il le fallait. Tu fais partie de mes belles rencontres à Dijon.

Christelle Philippeau, de mon enseignante, tu es passée à ma responsable de projet, puis après à une amie. Je fais un petit clin d'œil pour te dire merci pour la visite lors de ton passage à Montpellier. Ce fût un réel plaisir pour moi de te voir et de discuter avec toi.

Merci à **Gaël Thébaud**, **Emmanuel Jacquot**, **Emmanuel Wicker** et **Charlotte Tollenaere** pour les temps d'échanges, vos conseils et orientations surtout lors de ma préparation pour le concours de l'école doctorale. Ma plus belle récompense sera de vous dire bientôt que je commence un projet de thèse sur un sujet qui me passionne.

Un sincère merci à tous les membres de l'équipe CAMEPI spécialement **Thomas Armand, Léo Blondet, Marlène Souquet, Cica Urbino et Pascal Alonso** avec qui j'ai partagé d'excellents moments de joie. Un sourire, un mot pour me remonter le moral, des encouragements, tous vos gestes furent appréciés.

Un merci spécial à toi **Sandrine Cros-Arteil** pour ton amour envers ma personne et ton soutien lors de nos échanges pendant le déjeuner ou à l'électrophorèse. Je n'oublierai jamais cette belle phrase que tu m'as dite en guise d'aurevoir « *Accroche toi Grâce et finis bien ton rapport. Les gens qui te connaissent savent à quel point c'est merveilleux d'être autour de toi. N'hésite pas à nous solliciter si tu as besoin d'aide. Tu le mérites pleinement* ».

A tous les amis stagiaires et compagnons de bus, collègues du bureau 117, alternants et techniciens, je dis merci pour l'ambiance qui a régné entre nous pendant ces quelques mois : **Euridyce, Kader, Ismaeël, Landry, Automne, Mickael, Philomène, Marcos, Francisco, Raphaël, Maradiya, Romain, Henri et Nadia**. Bon courage à tous dans vos initiatives professionnelles respectives.

Je n'oublie pas mes amis de la 3^{ème} promotion du Master Agroécologie. Merci pour ces deux ans de fou rire et surtout un spécial big up à la meilleure équipe de projet : **Ahra, Omar, Yowen, Manoël et Solène**.

Mes chers parents, **Richard Houndafoche et Solange Houndeton**, malgré la distance, vous étiez présents. Recevez ce travail comme un aboutissement de vos efforts afin que je sois chaque jour une meilleure version de moi-même.

La famille Kotomale et spécialement à **Morel Kotomale** pour sa présence, son amour et son soutien depuis le début de cette aventure. Que les vœux secrets de mon cœur soient exaucés.

Mon frère **Espoir**, mes sœurs **Colombe et Basilia** et au couple **Kygo Anicet Happy** pour votre soutien, vos appels et tendres messages à chaque étape de ce long parcours.

A ma marraine **Nathalie Berruyer-Thomas** qui est toujours présente pour moi malgré la distance entre Dijon et Montpellier. Nathalie, tu sais qu'aujourd'hui, tu es comme une mère pour moi et comme tu le dis si bien rien ne peut effacer l'amour d'une mère pour ses enfants et vis-versa. Sois bénie à jamais.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	i
Remerciements	ii
Table des matières.....	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des annexes.....	viii
Introduction	1
I. Contexte et problématique de l'étude.....	2
1.1. Contexte	2
1.2. Problématique de l'étude	3
II. Matériel et méthodes.....	8
2.1. Matériel biologique	8
2.1.1. Matériel végétal.....	8
2.1.2. Isolats viraux et production de plantes sources	8
2.1.3. Elevage des pucerons	8
2.1.4. Inoculation du virus par pucerons aux plantes saines.....	9
2.2. Tests de détection et de quantification virale	10
2.2.1. Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)	10
2.2.2. Immunocapture-Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR).....	10
2.2.3. Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	12
2.3. Dispositifs expérimentaux	13
2.3.1. Evaluation de la capacité des isolats des souches PPV-T et PPV-An à infecter les pruniers et pêchers.....	13
2.3.2. Capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M	15
2.4. Analyses des données	16
III. Résultats	18
3.1. Capacité des souches PPV-T et PPV-An à infecter des plants de prunier et pêcher.....	18
3.1.1. Taux d'infection	18
3.1.2. Durée d'incubation	20

3.1.3. Intensité des symptômes	21
3.1.4. Accumulation virale	22
3.2. Capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M.	22
IV. Discussion	24
Références bibliographiques	29
Annexes	33

Liste des abréviations

AAP : Acquisition Access Period

ADNc : ADN complémentaire au brin d'ARN

AMV : Avian Myeloblastosis Virus

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ARN : Acide ribonucléique

BEYOND : Building epidemiological surveillance and prophylaxis with observations near and distant

CAMEPI : Caractérisation et modélisation des épidémies

CP : Protéine de capsid

Cq : Cycle de quantification en qPCR

DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ddl : degré de liberté

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

F : Statistique de Fisher

FAM : 6-carboxyfluorescéine

GLM : General Linear Model

IAP : Inoculation Access Period

IC 95 : Intervalle de confiance à 95%

JPI : Jours Post Inoculation

MGB : Minor Groove Binding

N : nombre d'observations

p : probabilité d'infection

P : Probabilité statistique

PBS-T : Phosphate Buffered Saline with Tween

PCR : Polymerase Chain Reaction

PHIM : Plant Health Institute of Montpellier

PPV : plum pox virus

qPCR : PCR quantitative

rpm : rotation per minute

RT : Reverse Transcription

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

TAE : Tris-Acétate-EDTA

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : ultraviolet

β : coefficient fourni par le modèle statistique

χ^2 : statistique de khi carré

Liste des figures

Figure 1 : Symptômes et dégâts de la sharka sur pruniers (A, B et C), abricotiers (D, E) et pêcher (F, G), (Garcia <i>et al.</i> , 2014).	4
Figure 2 : Carte génomique des <i>Potyvirus</i> (Revers & García, 2015).	5
Figure 4 : Diversité génétique du PPV détectée en Macédoine (Dallot, 2019, données non publiées). 6	
Figure 5 : a) Pucerons <i>M. persicae</i> déposés sur une feuille de prunier infectée par le PPV (AAP 5 min.) b) Plante saine confinée dans un tube Falcon de 50 mL avec les pucerons c) Confinement des pucerons sous manchon (transmission du PPV sur des pruniers déjà infectés par PPV-M.	9
Figure 6 : Dispositif expérimental mis en place pour évaluer la capacité des souches PPV-T et PPV-An à infecter les pruniers et pêchers en comparaison à la souche PPV-M.	13
Figure 7 : Feuilles prélevées pour : a) DAS-ELISA à 30 JPI : les feuilles encadrées en rouge sont celles prélevées. b) qPCR	14
Figure 8 : Dispositif expérimental mis en place pour évaluer la capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M.	15
Figure 9 : Stratégie de prélèvement des feuilles. La feuille encadrée en pointillée noire est celle prélevée pour le test DAS-ELISA.	16
Figure 10 : Taux d'infection des plantes par les souches PPV-M, PPV-T et PPV-An.	18
Figure 11 : Effet de l'accumulation virale dans les feuilles sources sur la réussite à l'infection pour chacune des souches sur pêchers.	19
Figure 12 : Durée d'incubation des souches PPV-M, PPV-T et PPV-An sur prunier et pêcher.	20
Figure 13 : Histogramme du nombre de plantes qui ont présentées chaque intensité de symptômes à 21 JPI (note entre 0 et 4, voir Annexe 4).	21
Figure 14 : Accumulation virale dans les plantes infectées.	22
Figure 15 : Taux d'infection par la souche T en infection simple et en infection multiple (PPV-M+T).	23

Figure 16 : Intensité des symptômes de la sharka en infection simple par PPV-T et en infection multiple PPV-M+PPV-T à 15 JPI et à 21 JPI.23

Liste des annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction des ARN avec le RNeasy plant mini kit (ANSES/LSV/MA 043 - Version 2, Décembre 2018)..... 33

Annexe 2 : Gamme-étalon utilisée pour la RT-qPCR basée la courbe standard obtenue avec trois répétitions de dilutions en série 10 fois des ARN transcrits du PPV. 34

Annexe 3 : Test du rapport de vraisemblance entre le modèle nul et le modèle intégrant l'effet de la feuille source sur la réussite à l'infection des plantes inoculées. 34

Annexe 4 : Grille de notation des symptômes du *plum pox virus* sur pruniers et pêchers 35

Introduction

En agriculture, les virus, les bactéries et les champignons sont les organismes pathogènes responsables des maladies des plantes (Anderson *et al.*, 2004). Ces agents pathogènes occasionnent des dégâts pouvant provoquer la mort des plantes, une perte de rendement ou encore une altération de la qualité des produits récoltés les rendant impropres à la consommation (Fried, 2017). Les virus constituent le groupe taxonomique le plus important avec près de 47 % des épidémies de maladies végétales (Anderson *et al.*, 2004). A l'échelle mondiale, les pertes économiques dues aux virus des plantes sont estimées à 60 milliards de dollars américains par an (Roossinck., 2011). Contrairement aux autres microorganismes pathogènes, aux ravageurs de culture et aux adventices, il n'existe pas de traitement curatif des virus de plantes (Oerke, 2006). Les méthodes de gestion des maladies virales reposent essentiellement sur le contrôle des sources d'inoculum (prophylaxie) et l'utilisation de variétés résistantes (Janssen & Ruiz, 2021). La mise en œuvre de ces stratégies de gestion nécessite une connaissance approfondie de la diversité des virus ainsi que de leurs interactions avec la plante hôte, leur(s) éventuel(s) vecteur (s) et l'environnement.

Les travaux de recherche de l'Unité Mixte de Recherche (UMR), Plant Health Institute of Montpellier (PHIM) visent à améliorer les connaissances sur la santé des plantes. Notamment, le pôle VIROM-Interactions virus-vecteurs-plantes a pour mission d'étudier les interactions moléculaires et cellulaires entre les plantes, les virus et leurs insectes vecteurs, ainsi que les dynamiques épidémiques et la gestion des maladies virales à l'échelle de la plante et celle du paysage. Au sein de ce pôle, l'équipe CAMEPI (Caractérisation et modélisation des épidémies) s'intéresse en particulier à l'épidémiologie des phytovirus pour en améliorer la surveillance et la gestion en combinant approche expérimentale et modélisation. Les principaux pathosystèmes étudiés dans l'équipe sont le plum pox virus (PPV) sur les espèces du genre *Prunus*, les *bégomovirus* sur la tomate, et les virus des grandes cultures (barley/cereal yellow dwarf viruses, wheat dwarf virus). Ce stage de master s'inscrit dans les actions du « workpackage » WP6 du projet ANR BEYOND (Building epidemiological surveillance and prophylaxis with observations near and distant) dont l'équipe CAMEPI est partenaire. Ce workpackage vise à faire évoluer les stratégies de surveillance de maladies en y intégrant notamment de nouvelles données sur leur épidémiologie et/ou de nouveaux outils de diagnostic.

Ce rapport présente dans un premier temps, le contexte et la problématique de l'étude, ensuite le matériel et les méthodes utilisés pour répondre à la question de recherche et enfin les résultats obtenus qui seront par la suite discutés.

I. Contexte et problématique de l'étude

1.1. Contexte

Ces dernières décennies, l'apparition de nouvelles maladies ou la résurgence d'agents pathogènes précédemment décrits sont de plus en plus rapportées dans le règne animal comme végétal. Les maladies émergentes constituent une menace pour la sécurité alimentaire et la conservation de la biodiversité (Anderson *et al.*, 2004 ; Mitra, 2021). Elles sont causées soit par (i) des pathogènes dont leur incidence, leur répartition géographique ou leur gamme d'hôte sont en accroissement ; (ii) des agents infectieux qui ont connu une modification de leur pathogénicité, (iii) des pathogènes dont la biologie a évolué ou qui ont récemment été découverts (Daszak *et al.*, 2000). Dans les agrosystèmes, l'introduction d'agents pathogènes, les événements climatiques extrêmes, les changements de pratiques agricoles et les modifications des paysages sous l'action de l'homme ont été identifiés comme principaux facteurs pouvant expliquer les émergences de maladies (Anderson *et al.*, 2004).

La majorité (71%) des maladies virales émergentes sont dues à l'introduction de nouvelles espèces ou de nouveaux variants d'une même espèce de virus de plante dans des régions où elle n'était pas présente (Anderson *et al.*, 2004). Ces événements d'introduction sont essentiellement liés aux activités humaines à travers les activités commerciales et l'anthropisation des écosystèmes sauvages (Anderson *et al.*, 2004). Par exemple, le virus du fruit rugueux brun de la tomate (ToBRFV) est un virus émergent identifié en Israël et qui s'est propagé dans le reste du monde grâce aux échanges internationaux de semences (Rizzo *et al.*, 2021 ; Salem *et al.*, 2016).

Des modifications dans la composition génétique des virus à travers les processus évolutifs tels que la mutation, la recombinaison ou le réassortiment peuvent également conduire à l'émergence de nouvelles espèces virales ou de nouveaux variants d'une espèce déjà décrite (García-Arenal *et al.*, 2001, 2003 ; Roossinck, 1997). Lors d'une épidémie, la population de virus est souvent diverse, composée de plusieurs souches d'un même virus. Ces souches peuvent présenter des différences biologiques, sérologiques et/ou moléculaires stables (Fauquet *et al.*, 2008). Plusieurs variants d'un même virus peuvent infecter un même hôte, causant ainsi des infections multiples (Syller, 2012, 2020). Au sein d'une même plante hôte, les virus ou variants viraux peuvent occuper des niches différentes. Si plusieurs virus partagent une même cellule hôte, ceux-ci peuvent recombiner, augmentant encore la diversité du pathogène. L'étude de la dynamique des populations de tomates co-infectées par le tomato yellow leaf curl virus

(TYLCV) et le tomato leaf curl comoros virus (ToLCKMV) a ainsi permis de détecter 177 nouveaux virus recombinants (Urbino *et al.*, 2013).

Souvent les infections multiples conduisent à des changements dans les propriétés biologiques tels que l'accumulation virale, la transmission et la virulence des virus impactant ainsi la dynamique des épidémies (Tollenaere *et al.*, 2016). Lorsque des virus cohabitent dans un même hôte, ils interagissent entre eux pour produire soit un effet synergique, antagoniste ou neutre (Janssen & Ruiz, 2021 ; Jeger *et al.*, 2006 ; Syller, 2020). Dans les relations synergiques, l'un des virus bénéficie de l'autre impliquant une augmentation de sa pathogénicité et de sa capacité à être efficacement propagé par le vecteur par rapport à une infection unique (Moreno & López-Moya, 2020). L'introduction sur l'île de la Réunion des souches IL et Mld du virus émergent tomato yellow leaf curl virus a induit des scénarios d'exclusion compétitive. L'infection des plants de tomate par la souche invasive TYLCV-IL a augmenté les taux de transmission et l'accumulation de TYLCV-Mld. Ce changement dans les propriétés épidémiques de TYLCV-Mld a favorisé la propagation de la maladie (Pérefarres *et al.*, 2014).

La diversité des virus de plantes combinées à leur capacité à s'adapter ou non à de nombreuses plantes hôtes constituent un facteur clé dans l'émergence de nouveaux virus et la réémergence de virus déjà existant (Domingo, 2010 ; Rojas *et al.*, 2008). Mieux comprendre la diversité des virus de plantes et leurs propriétés biologiques s'avère indispensable pour une meilleure gestion des épidémies.

1.2. Problématique de l'étude

Le PPV est un virus de la famille des *Potyviridae* responsable de la sharka. La sharka est la virose la plus importante des arbres fruitiers à noyau tels que les pêchers (*Prunus persica*), les abricotiers (*Prunus armeniaca*) et les pruniers (notamment *Prunus domestica*, *Prunus salicina*) (Garcia & Cambra, 2007 ; García *et al.*, 2014). Elle a également été décrite sur le prunier subsponsané myrobolan (*Prunus cerasifera*) (Damsteegt *et al.*, 2007). Certaines espèces de *Prunus* sauvages peuvent aussi servir de réservoirs de virus et présenter un risque pour les vergers (Rimbaud *et al.*, 2015a). Les plantes infectées par le PPV présentent des symptômes qui peuvent apparaître sur les feuilles, les fleurs, les fruits et les noyaux en fonction de la plante hôte, du cultivar et des conditions climatiques (Barba *et al.*, 2011). Sur les feuilles, la sharka cause une légère décoloration vert clair, des taches, ou des anneaux chlorotiques, un éclaircissement ou un jaunissement des nervures et une déformation. Les fruits infectés

présentent des taches chlorotiques ou des anneaux, des déformations et des nécroses internes (Figure 1) (García *et al.*, 2014). La virose peut entraîner une chute prématurée des fruits et impacter leur qualité organoleptique les rendant impropre à la consommation (García *et al.*, 2014 ; Milošević *et al.*, 2019). Ces dégâts ont un impact économique substantiel, avec des pertes de rendement pouvant atteindre 100 % pour les cultivars les plus sensibles (Kegler & Hartmann, 1998).

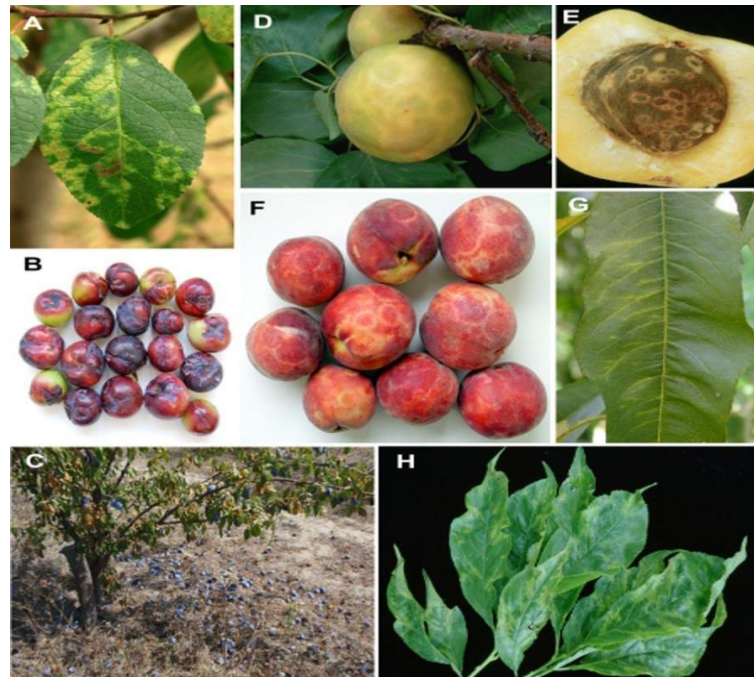


Figure 1 : Symptômes et dégâts de la sharka sur pruniers (A, B et C), abricotiers (D, E) et pêcher (F, G) (Garcia *et al.*, 2014).

Le PPV est transmis par au moins vingt espèces de pucerons selon le mode non persistant mais peut aussi être transmis lors de la multiplication végétative du matériel végétal (Labonne & Dallot, 2006 ; Rimbaud *et al.*, 2015a). Les pucerons acquièrent rapidement le virus lors des piqûres d'essai sur la plante (30 secondes) et peuvent le porter à l'extrémité de leurs stylets jusqu'à une heure environ. Pendant cette période les pucerons sont capables de transmettre le virus d'une plante à une autre (Gildow *et al.*, 2004 ; Labonne *et al.*, 1995).

Le génome du PPV est constitué d'un ARN simple brin de sens positif (ARNsb +), avec une protéine VPg reliée à son extrémité 5' et une queue poly A terminale 3' (Riechmann *et al.*, 1989). La taille du génome varie entre 9741 et 9795 nucléotides. Il est encapsidé par un seul type de protéine de capsid (CP) dans des particules de bâtonnets flexueux et est traduit en une grande polyprotéine qui est traitée protéolytiquement en au moins 10 produits finaux : P1,

HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIapro, NIB et CP (García *et al.*, 2014). Comme indiqué pour d'autres *Potyvirus* (Chung *et al.*, 2008), une autre protéine du PPV, P3N-PIPO, est produite par un changement de cadre dans un court ORF intégré dans la séquence codante P3 (Figure 2).

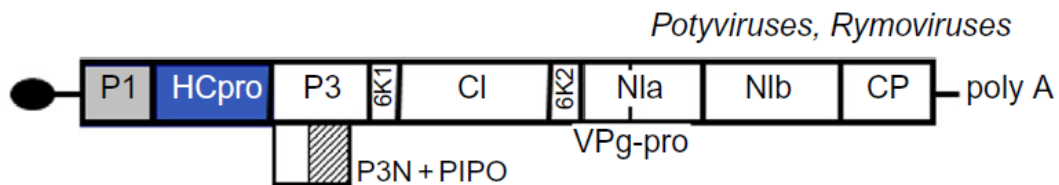


Figure 2 : Carte génomique des *Potyvirus* (Revers & García, 2015).

Le PPV présente une certaine diversité génétique avec dix souches (PPV-D, PPV-M, PPV-EA, PPV-C, PPV-Rec, PPV-W, PPV-T, PPV-CR, PPV-An et PPV-CV) actuellement décrites au niveau mondial (García *et al.*, 2014 ; Rimbaud *et al.*, 2015a ; Chirkov *et al.*, 2018). La recombinaison génétique a joué un rôle prédominant dans l'évolution du PPV. PPV-M, PPV-D, PPV-Rec, PPV-T et PPV-An sont des souches qui sont liées évolutivement à travers une recombinaison ancestrale affectant leur partie 5' (Dallot, 2019 ; Garcia *et al.*, 2014) (Figure 3). Ces différentes souches se répartissent en fonction des régions et de la gamme d'hôte. PPV-M et PPV-D sont les premières souches identifiées (Kerlan & Dunez, 1979). La souche PPV-T a été signalée pour la première fois en Turquie sur abricotier (Ulubaş Serçe *et al.*, 2009) puis sur d'autres espèces cultivées essentiellement en zones résidentielles (Gurcan & Ceylan, 2016) mais sa présence est anecdotique en verger. Ailleurs, elle n'a été détecté qu'en Albanie (Palmisano *et al.*, 2015). Les souches PPV-CV et PPV-CR quant à elles, sont présentes en Russie et dans d'autres pays de l'ex- URSS et sont les seules souches capables d'infecter les cerisiers doux et acides (Sheveleva *et al.*, 2012). PPV-W a été détecté initialement au Canada (James & Varga 2005) puis par la suite en Russie, dans certains pays de l'est de l'Europe (Glasa *et al.*, 2011 ; Mavrodieva *et al.*, 2013 ; Sheveleva *et al.*, 2012) et au Kazakhstan (Dallot *et al.*, 2019) sur pruniers et prunelliers. La souche PPV-EA a été détecté uniquement en Egypte alors que PPV-An n'est présente qu'en Albanie (Palmisano *et al.*, 2012).

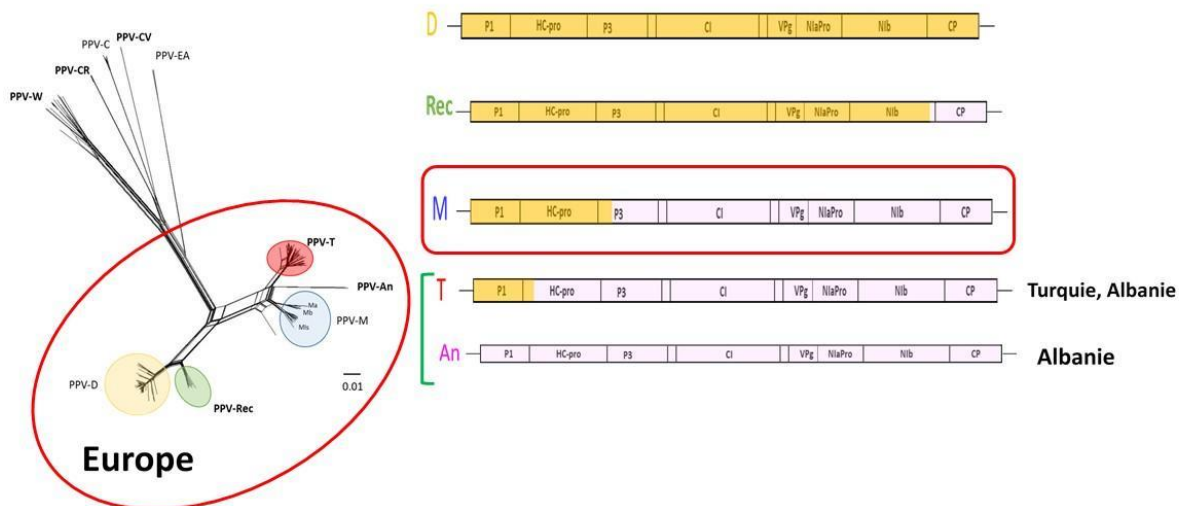


Figure 3 : Diversité du PPV et analyse de recombinaison des souches (Dallot, 2019 ; Garcia *et al.*, 2014).

Dans les agrosystèmes européens, trois souches (PPV-M, PPV-D et PPV-Rec) provoquent des épidémies de sharka en vergers. Les études épidémiologiques ont montré que PPV-M est la souche la plus épidémique par rapport à PPV-D et PPV-Rec (Capote *et al.*, 2010 ; Labonne & Dallot, 2006 ; Schneider *et al.*, 2011). Récemment, il a été suggéré que le sud des Balkans (Macédoine et Albanie) était un « point chaud » de diversité virale avec six souches de PPV détectées sur un prunier sub-spontané (myrobolan) dont PPV-T et PPV-An (Figure 4) (Dallot, 2019, données non publiées). Par contre, ces dernières n’ont jamais été détectées dans les vergers européens.

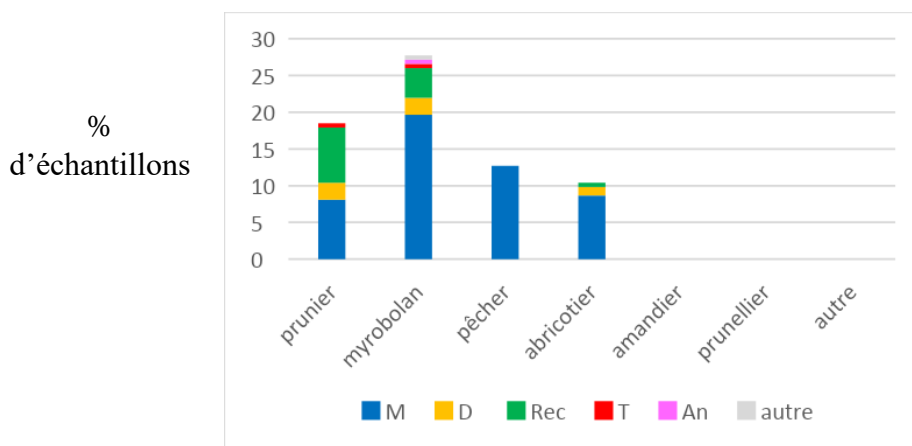


Figure 4 : Diversité génétique du PPV détectée en Macédoine (Dallot, 2019, données non publiées).

Leurs propriétés épidémiques et leur compétitivité vis-à-vis des souches déjà présentes en Europe ne sont pas encore connues. De nombreux virus émergents comme le virus de la mosaïque de la laitue (LMV) et le virus de la mosaïque du pépino (PepMV) ont été transmis à une espèce végétale cultivée à partir d'espèces sauvages du même genre (Gomez *et al.*, 2012 ; Krause-Sakate *et al.*, 2002). Il est donc essentiel de caractériser biologiquement les souches PPV-T et PPV-An en vue d'anticiper l'impact de leur éventuelle dispersion sur les espèces cultivées. C'est dans cette perspective que ce stage a été proposé afin de répondre à la question de recherche suivante : **Quelles sont les propriétés épidémiques des souches PPV-T et PPV-An sur prunier et pêcher ?**

De façon spécifique, l'objectif de ce stage est dans un premier temps de déterminer la capacité des souches PPV-T et PPV-An à infecter deux espèces cultivées, le prunier et le pêcher par rapport à la souche PPV-M. La souche PPV-M étant identifiée comme la plus épidémique sur les espèces cultivées en Europe, nous supposons que son potentiel d'infection (taux d'infection, durée d'incubation et accumulation virale) serait plus élevé que celui des souches PPV-T et PPV-An aussi bien sur le prunier que sur le pêcher.

Dans un deuxième temps, il a été question de déterminer la capacité de la souche PPV-T à surinfecter des plants de prunier préalablement infectés par la souche PPV-M. Il a été récemment démontré que le prunier domestique pouvait héberger plusieurs souches de PPV en même temps (infections multiples impliquant les souches PPV-M, PPV-D et PPV-Rec (Dallot *et al.*, 2020). La capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers infectés pourrait impacter les dynamiques de sharka en vergers.

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Matériel végétal

Des semences des cultivars Brompton et Montclar ont respectivement été utilisées pour la production des plants de prunier (*Prunus domestica*) et de pêcher (*Prunus persica*). Ces semences sont certifiées sans virus. Les semis ont été réalisés dans des cellules climatiques (16 h de jour à 23°C / 8 h de nuit à 18°C) dans des terrines couvertes d'une cloche au début de la germination. Le substrat de plantation était constitué d'un mélange de terreau (80 %) et de vermiculite (20 %). Après semis, les graines ont été traitées au fongicide Shift (1g/L) pour lutter contre la pourriture du collet et la fonte des semis. Le repiquage des plants a été fait 21 jours après semis pour les pruniers et 15 jours après semis pour les pêchers dans des pots individuels de 9×9 cm précédemment remplis d'un mélange terreau (85 %) + vermiculite (13 %) + osmocote (2 %). L'arrosage a été fait tous les deux jours et selon les besoins en eau des plants. Si nécessaire, les plants ont été traités avec une solution de soufre (8g/L) pour lutter contre l'oïdium. Afin de réduire la pression des mouches de terreau (sciarides), des pièges englués jaunes ont été suspendus au-dessus des plantes et une lutte biologique utilisant des acariens prédateurs (hypoaspis-system, Biobest) a été mise en place.

2.1.2. Isolats viraux et production de plantes sources

Les isolats des souches PPV-M (19-530), PPV-T (19-526) et PPV-An (19-525) collectés en 2019 en Macédoine et maintenus sur des plants de porte-greffe JASPI-Fereley (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x *P. spinosa* ont été utilisés. Ces trois isolats ont été séquencés entièrement confirmant leur appartenance aux trois souches citées. Dans la suite de la rédaction de ce document, ces isolats vont représenter les souches PPV-M, PPV-T et PPV-An. Le terme « souche » sera utilisée à chaque fois que nous parlerons des isolats testés.

2.1.3 Elevage des pucerons

Le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae* Sulzer) reconnu comme le meilleur vecteur de la souche PPV-M (Labonne *et al.*, 1995) a servi à la transmission du virus des plantes infectées aux plantes saines lors des expérimentations. Les pucerons ont été élevés en cages sur des plantes d'aubergine (*Solanum melongena* L.), dans des chambres climatiques (8 h de nuit à 18°C/ 16 h de jour à 24°C). Les larves de stade L2 à L4 ainsi que les adultes aptères ont été utilisés. Douze jours avant la transmission du virus aux plantes, une production massive des

pucerons est lancée à raison de 100 pucerons adultes par aubergine en vue d'obtenir essentiellement des individus aptères.

2.1.4. Inoculation du virus par pucerons aux plantes saines

Cinquante à 100 individus aptères en fonction des objectifs de l'inoculation (production de plante source, infection simple, surinfection) sont triés à l'aide d'un aspirateur à bouche et mis à jeûner pendant environ 1 h dans des micro-tubes de 1,5 mL. Pendant la phase d'acquisition, des feuilles de pruniers infectés ont été détachées des plantes sources et maintenues turgescentes. Le pétiole de chaque feuille source est maintenu dans un micro-tube 1.5 mL rempli d'eau et fermé par du parafilm, le tout déposé dans une boîte de Pétri. Les pucerons précédemment triés et mis à jeûner sont déposés sur la face inférieure des feuilles infectées et maintenus en acquisition pendant 5 min (AAP) (Figure 5-a). Pendant la phase de transmission proprement dite (IAP), les pucerons sont retirés des feuilles sources puis transférés sur les plantes saines confinées dans des tubes Falcon de 50 mL bien fermés (Figure 5-b). Pour la seconde expérimentation, les pucerons ont été déposés sur la partie terminale des plantes (quatre dernières feuilles) confinée dans un manchon de voilage, fermé par un disque en mousse à la base de la tige et par des pinces à cheveux à l'autre extrémité (Figure 5-c). Après une durée d'inoculation de 17 h environ, les plantes sont traitées avec l'insecticide PRIMOR® 50 DG (Pyrimicarbe) à 0,1% (0,2g/L) pour détruire les pucerons puis placées en chambre de culture.

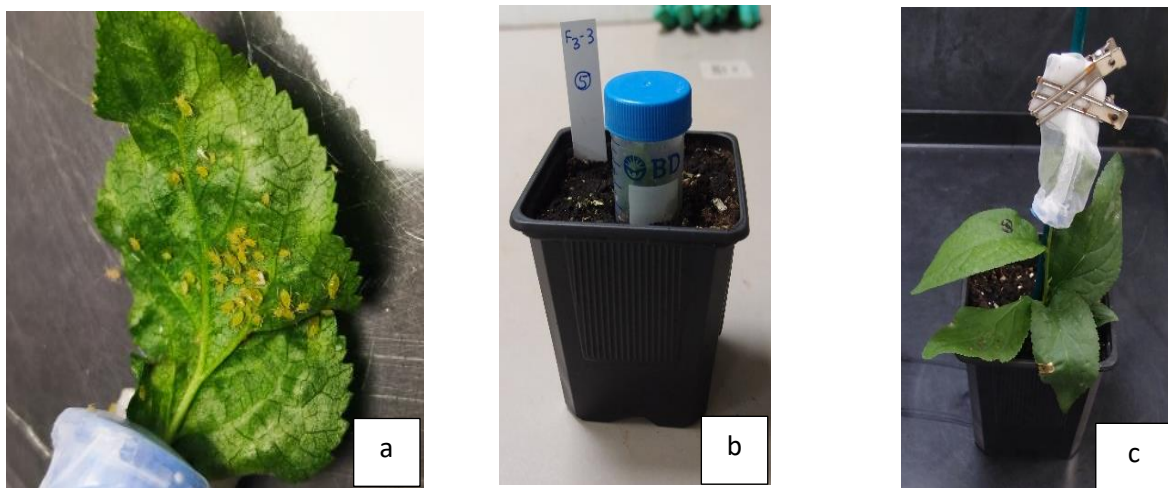


Figure 5 : a) Pucerons *M. persicae* déposés sur une feuille de prunier infectée par le PPV (AAP 5 min.) b) Plante saine confinée dans un tube Falcon de 50 mL avec les pucerons c) Confinement des pucerons sous manchon (transmission du PPV sur des pruniers déjà infectés par PPV-M).

2.2. Tests de détection et de quantification virale

2.2.1. Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)

La présence du virus dans les plants inoculés a été recherchée par test immunologique Double Antibody Sandwich- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, (DAS-ELISA). Il s'agit d'une méthode en microplaque 96 puits qui repose sur une interaction antigène-anticorps révélée à l'aide d'une réaction enzymatique de dégradation d'un substrat (Clark & Adams, 1977 ; Yadav & Khurana, 2015). Le kit AGDIA-PPV a été utilisé en suivant les recommandations du fournisseur à chaque étape du processus. Les puits sont d'abord recouverts d'anticorps polyclonaux (100 µL/puits) dilués (1/200 (v/v) dans du tampon carbonate (1,59 g de Na₂CO₃ ; 2,93 g de NaHCO₃ pour 1000 mL d'eau distillée, pH = 9,6) et incubés à température ambiante pendant 3 à 4 h. Après cette étape, les puits sont rincés avec du tampon PBS-T 1X (Phosphate Buffered Saline with Tween : 8 g de NaCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,2 g de KCl, 0,24 g de KH₂PO₄, avec 0,05% (v/v) de Tween 20 pour 1000 mL d'eau distillée, pH = 7,4). Tous les échantillons de feuilles ont été broyés à l'aide d'un broyeur à billes au 1/10 (m/vol) dans un tampon GEB4 (General Extract Buffer 4 : 33g, 20 mL de Tween pour 1000 mL d'eau distillée). Les extraits végétaux (100 µl) pour chaque échantillon sont ensuite déposés dans les puits précédemment rincés et mis en incubation pendant une nuit à 4°C. Après cette phase d'incubation, les puits sont à nouveau rincés au PBS-T et une solution d'anticorps polyclonaux couplé à la phosphatase alcaline dilués dans le tampon RUB3 (1/200 (v/v) est ajoutée. Il s'en suit une incubation de la plaque à température ambiante pendant 2 h et les puits sont rincés. Après ce dernier rinçage, les puits sont remplis par 100 µL de p-nitrophényl phosphate (1mg/mL) dilué dans un tampon de substrat (Diéthanolamine, 97 mL pour 1000 mL d'eau distillée, pH = 9,8) et la plaque est placée dans l'obscurité à température ambiante. La densité optique de chaque puits a été mesurée 15 min, 30 min, 1 h et 2 h après incubation à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific). Le seuil de détection a été fixé à trois fois la valeur moyenne de la densité optique à 405 nm des échantillons de plantes non infectées. Outre les échantillons à tester, chaque plaque comportait 2 à 4 puits avec des échantillons de témoins non infectés, un puits avec le contrôle positif du kit ainsi que deux puits blancs remplis uniquement avec les tampons.

2.2.2. Immunocapture-Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (IC-RT-PCR)

Un protocole d'Immunocapture-Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction(IC-RT-PCR) point final (Wetzel *et al.*, 1992) a été utilisé pour détecter et différencier les deux

souches de PPV testées pendant les essais de surinfection. Des plaques de PCR de 96 puits sont utilisées pendant cette réaction. Des étapes de coating et d'immunocapture ont précédé la phase de transcription inverse (RT). Pour ce faire, les anticorps ont été dilués dans du tampon carbonate (1/500 (v/v)) et 100 µL de la solution a été déposé dans chaque puits. La plaque a été incubée à 37°C en boîte humide pendant 3 à 4h puis rincée avec du PBS-T. Les échantillons sont ensuite broyés au 1/10 (m/v) dans une solution de PBS-T+2% PVP (Polyvinylpyrrolidone) et 0,45 % de NaDieca (Diethyldithiocarbamic acid sodium trihydrate cristalline). Après le broyage, une clarification est réalisée à 10 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Pour chaque échantillon, 100 µL d'extraits végétaux ont été déposés dans le puits concerné et mis en incubation pendant une nuit à 4°C. La plaque a été rincée deux fois au PBS-T et une fois à l'eau grade biologie moléculaire (garantie sans Dnase et Rnase). Les plaques ont été conservées au congélateur à -20°C ou directement utilisées pour la RT.

Afin de libérer l'ARN des particules virales piégées dans les puits de la plaque, une dénaturation des protéines de capsid est d'abord réalisée en présence de détergent (Triton X100) et à haute température (le mix est composé de 8,1 µL d'eau de biologie moléculaire ; 3 µL de Triton X100 à 1,7% et 0,4 mM d'amorces aléatoires (Promega) pour une réaction finale de 25 µL). La plaque a été incubée à 70°C pendant 5 min au thermocycleur (Biometra). Le mix de RT est complété avec 4,95 µL d'eau de biologie moléculaire ; 5 µL de tampon de réaction 5X ; 2,5 unités d'AMV transcriptase inverse (Promega) ; 8 unités de Rnase inhibiteur (Promega) et 2,5 µL de dNTPs à 2,5mM par puits. La plaque est à nouveau incubée à 37°C pendant 1h, 95°C pendant 5min et à 4°C pendant 5 min au thermocycleur.

Après la synthèse de l'ADNc, la réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL contenant 14,5 µL d'eau de biologie moléculaire, 2,5 µL de PCR buffer 10X ; 2,5 µL de dNTPs (2,5mM) ; 0,5 µL d'amorces sens à 10 µM ; 0,25 µL d'amorces anti-sens à 10 µM ; 0,75 µL de MgCl₂ ; 1,25 unités de Taq polymérase et 2 µL d'ADNc. Le couple d'amorces MT-1365F : 5'-CTAAAGAGGTATCGTGAATTGATGC-3'(Sens) /T-1797R : 3'TAGGGTTCTCGCGAATGATG-5' (AntiSens) permet la détection spécifique de PPV-T alors que le couple MT-1365F/M-1698R : 3'-CCCACACGAAATTGCCATTAG-5' (AntiSens) permet la détection spécifique de PPV-M. Le programme utilisé pour les réactions de PCR est le suivant : 1 : 94°C pendant 5 min, 2 : 94°C pendant 20 s, 3 : 59°C pendant 20 s, 4 : 72°C pendant 40 s, 5 : 72°C pendant 10 min avec 40 cycles pour les étapes de 2 à 4. Après l'amplification, 4 µL des produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % dans un tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA). Les conditions de migration étaient de 100

V pendant 30 à 35 min. En fin de migration, le gel est déposé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 10 min et rincé dans de l'eau. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous lumière UV (logiciel Bio-Vision).

2.2.3. Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

La RT-qPCR utilisant la sonde Taqman MGB (5' 6-FAM - TTC-AAC-AAC-GCC-TGT-G - MGB-Eclipse® 3') couplée au fluorophore 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) a permis de quantifier l'ARN viral de chaque souche dans les plantes testées (Olmos *et al.*, 2007). L'extraction des acides nucléiques dans les échantillons foliaires a été réalisée avec le kit d'extraction RNAeasy plant minikit (QIAGEN®), selon le protocole LSV/MA 043 validé par l'ANSES (Annexe 1). Les éluats obtenus après l'extraction ont été dosés par densitométrie UV (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific) en vue d'évaluer la pureté de l'extraction et la quantité en ARN des échantillons. Les ARN extraits sont conservés au congélateur à -80°C pour des utilisations futures. Pour chaque espèce-hôte, une gamme-étalon a été réalisée à partir d'ARN transcrits *in vitro* dilués de 10 en 10 dans des extraits de plante saine (Annexe 2). Ces gamme-étalon ont permis d'estimer la concentration en ARN dans les échantillons testés (Olmos *et al.*, 2005).

Pour les échantillons testés et la gamme-étalon, le kit « Transcriptor First Strand cDNA Synthesis » de Roche a été utilisé pour l'étape de transcription inverse (RT) selon le protocole du fabricant. L'amorce P1 9505 (5-CTC-TCT-GTG-TCC-TCT-TCT-TGT-G-3') utilisée pendant la RT permet la détection de toutes les souches connues du PPV. Les réactions de qPCR ont été réalisées dans une plaque de 384 puits compatible avec le LightCycler 480® (Roche). Le kit LightCycler 480 Probes Master (Roche) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc obtenus à la fin de la RT ont été dilués au 1/10 dans de l'eau de grade biologie moléculaire avant d'être utilisés. Les amorces et la sonde utilisées pendant la réaction ont été précédemment designées pour détecter spécifiquement un isolat de la souche PPV-Rec mais elles sont parfaitement homologues au génome des souches PPV-M et PPV-T. Le mix réactionnel de la PCR a été réalisé dans un volume final de 10µL contenant 2,8 µL d'eau de biologie moléculaire, l'amorce sens qRec-F (5'-CGC-CAG-ATA-CGC-CTT-TGA-T-3') (0,5 µM), l'amorce antisens qRec-R (3'-GCT-GCT-GCC-TTC-ATC-TGT-AT-5') (0,5 µM), la sonde Rec FAM (0,2 µM), 1µL d'ADNc et 5µL de Probe master mix 2X. Le cycle de qPCR (10 min à 95°C suivi de 40 cycles de 10 s à 95°C, 30 s à 57°C et de 1min à 72°C ; puis 30s à 40°C). Pendant la qPCR, l'intensité de fluorescence de la sonde FAM (465 nm-510 nm) a été

enregistrée pour chaque échantillon et pour chaque point des gammes-étalon. Le logiciel LinRegPCR (version 2021.2) a permis de calculer les efficacités individuelles d'amplification et les valeurs de Cq (Ruijter *et al.*, 2009).

2.3. Dispositifs expérimentaux

Les différentes expérimentations ont eu lieu dans des chambres climatiques situées dans un local confiné de type NS3 conformément à la réglementation en vigueur (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2021), les souches PPV-T et PV-An n'étant pas présentes dans l'union européenne. Les conditions dans la chambre climatique étaient de : 24°C/21°C ; à 16h/18h, jour/nuit.

2.3.1. Evaluation de la capacité des isolats des souches PPV-T et PPV-An à infecter les pruniers et pêchers

Cette expérimentation vise à évaluer la capacité des isolats des souches PPV-T et PPV-An à infecter des jeunes plants de pêcher et prunier après inoculation par pucerons. Les variables mesurées étaient : le taux d'infection (nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées à 28 JPI (Jours Post-Inoculation)), la période d'incubation (temps qui s'écoule entre l'inoculation et l'apparition des premiers symptômes (Anderson & May, 1992)), l'intensité des symptômes et l'accumulation virale. Ces variables ont été comparées à celles obtenues avec la souche PPV-M (Figure 6).

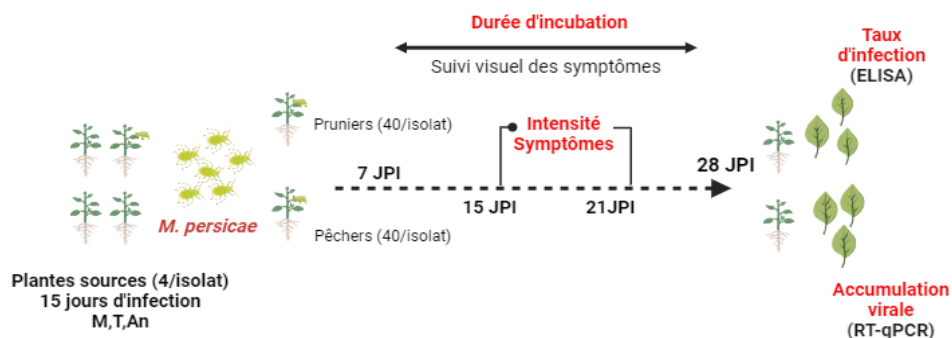


Figure 6 : Dispositif expérimental mis en place pour évaluer la capacité des souches PPV-T et PPV-An à infecter les pruniers et pêchers en comparaison à la souche PPV-M.

- ❖ Inoculation : Pour l'inoculation des plantes, quatre feuilles/ souche présentant des symptômes de sharka prélevées sur des plants de pruniers infectés 28 JPI ont été utilisées comme sources de virus. Chaque feuille a été utilisée pour inoculer 10 pruniers et 10

pêchers sains (soit 40 plantes/espèce/souche). Le protocole de transmission a été réalisé comme décrit précédemment en utilisant 65 ± 5 individus de *M. persicae* par plante.

- ❖ Suivi de l'apparition des symptômes et du développement des plantes post-inoculation : La présence de symptômes sur les plantes a été recherchée entre le 7^{ème} et le 25^{ème} jour post inoculation, tous les deux jours. L'intensité des symptômes a été mesurée au 15^{ème} et au 21^{ème} JPI selon une échelle de notation allant de 0 à 4 (Annexe 4). Au 15^{ème} JPI, la dernière feuille étalée a été marquée. Le nombre de feuilles développées ainsi que le nombre de feuilles présentant des symptômes ont aussi été comptés à chaque mesure de l'intensité.
- ❖ Taux d'infection : Seules les plantes asymptomatiques ou dont les symptômes étaient douteux ont été testées en DAS-ELISA 28 JPI afin de confirmer leur statut sanitaire. Les feuilles (2 par plante) prélevées pour le test étaient celles situées en dessous et au-dessus de la feuille marquée au 15^{ème} JPI (Figure 7a).
- ❖ Evaluation de l'accumulation virale : L'accumulation virale dans les plantes infectées a été quantifiée par RT-qPCR. Pour chaque souche de PPV, 10 pruniers et 10 pêchers ont été choisis aléatoirement. Pour chaque plante choisie, trois feuilles ont été prélevées (Figure 7b). Sur le pêcher et pour les souches PPV-T et PPV-An, moins de 10 plantes inoculées étaient infectées. Dans ce cas, toutes les plantes infectées ont été prélevées.



Figure 7 : Feuilles prélevées pour : a) DAS-ELISA à 30 JPI : les feuilles encadrées en rouge sont celles prélevées. b) qPCR : les feuilles encadrées en pointillées noires sont celles qui ont été prélevées pour quantifier l'accumulation virale dans les plantes. La feuille colorée en rouge est celle qui a été marquée à 15 JPI.

2.3.2. Capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M

L'objectif de ce deuxième essai est de déterminer la capacité de la souche PPV-T à surinfecter des plants déjà infectés par PPV-M. Les variables mesurées sont : l'intensité des symptômes au 15^{ème} et au 21^{ème} JPI puis le taux d'infection des plantes par PPV-T. Des plants de pruniers infectés uniquement par la souche PPV-T ont servi de lot témoin (Figure 8).

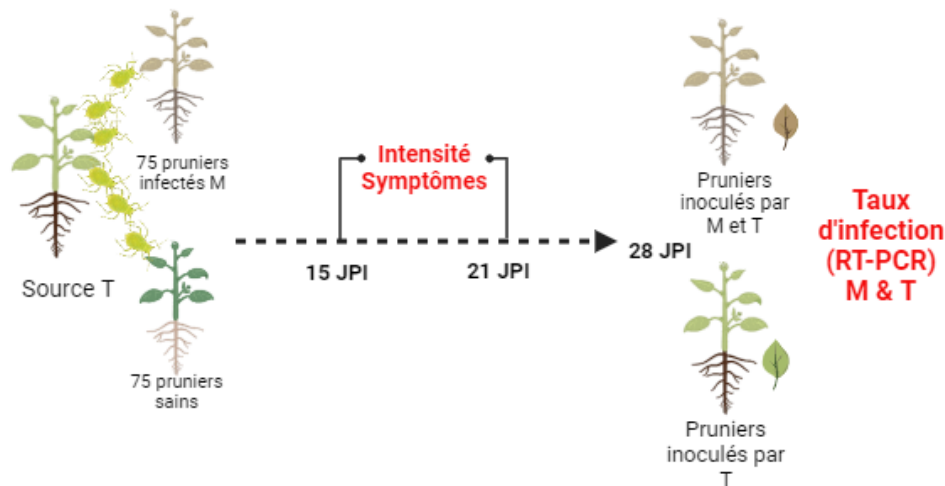


Figure 8 : Dispositif expérimental mis en place pour évaluer la capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M

- ❖ Inoculation des plantes par PPV-M : Des pruniers infectés par PPV-M ont été utilisés à 28 JPI pour servir de sources de virus afin d'inoculer 90 plants de prunier sains (100 pucerons par plante). Un suivi visuel de l'apparition des symptômes et du développement des plants a été fait tous les deux jours du 7^{ème} au 21^{ème} JPI. Les plantes présentant une croissance active 21 JPI ont été prélevées (1 feuille / plante) et testées par DAS-ELISA afin de vérifier la présence du virus. Soixante-quinze plantes en croissance et infectées par PPV-M ont été utilisées pour la suite de l'expérimentation (Figure 8).
- ❖ Inoculation des plantes par PPV-T : Les 75 pruniers déjà infectés par PPV-M et 75 pruniers sains ont été inoculés par la souche PPV-T avec 80 pucerons par plante. Des pruniers infectés par PPV-T à 21 JPI ont été utilisés comme source d'inoculum. Au total, sept feuilles sources ont été utilisées et chaque feuille source a permis l'inoculation d'un lot de pruniers sains et d'un lot de pruniers infectés par PPV-M. Avant

l'inoculation des plantes, la dernière feuille étalée non utilisée pour la sur-inoculation a été marquée (Figure 9).

- ❖ Intensité des symptômes : L'intensité des symptômes a été évaluée au 15^{ème} et au 21^{ème} jours après l'inoculation des plantes par PPV-T selon l'échelle de notation précédemment décrite.
- ❖ Taux d'infection par PPV-T : Le taux d'infection correspond au nombre de plantes infectées par PPV-T / nombre de plantes inoculées. On distingue le taux d'infection en inoculation simple (inoculation des plantes saines) et le taux de surinfection (inoculation des plantes précédemment infectées par PPV-M). Pour déterminer le statut sanitaire des plantes, toutes les feuilles qui se sont développées au-dessus de celles inoculées ont été prélevées au 28^{ème} JPI puis analysées par IC-RT-PCR (Figure 7).

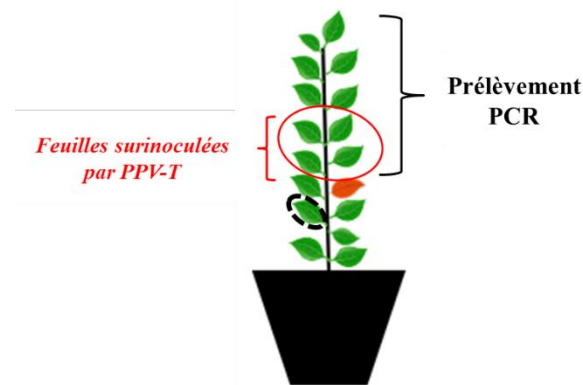


Figure 9 : Stratégie de prélèvement des feuilles. La feuille encerclée en pointillée noire est celle prélevée pour le test DAS-ELISA. La feuille colorée en orange est la dernière feuille non utilisée pour la sur-inoculation par la souche PPV-T. Les quatre feuilles encerclées en rouge représentent les feuilles sur-inoculées par PPV-T. Les feuilles au-dessus de celles encerclées sont celles qui se sont développées après la surinoculation.

2.4. Analyses des données

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R Core Team 2023 (version 4.3.3). Pour tous les tests effectués, le seuil de significativité a été fixé à 5%. Des modèles linéaires généralisés (GLM, famille binomiale) ont permis d'étudier l'effet de la souche, de l'espèce hôte et de la feuille source sur le taux d'infection des plantes. L'effet de la charge en virus dans les feuilles source sur la réussite à l'infection de chaque espèce hôte a été analysé à l'aide d'une régression linéaire.

Pour analyser les données relatives à la durée d'incubation, des courbes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier avec les packages survival et survminer (Therneau, 2015 ; Kassambara *et al.*, 2017).

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a permis de comparer l'intensité des symptômes (notation qualitative, voir 2.2) entre les différentes souches en infection simple et multiple. Quand le test de Kruskal-Wallis a indiqué une différence significative entre les souches, le test post-hoc de Dunn a été réalisé pour identifier quelle souche diffère de l'autre.

Les concentrations en ARN viral dans les échantillons foliaires prélevés ont été prédites à partir des gammes-étalon par la régression linéaire du cycle seuil de PCR (Cq) sur le log (Nombre de copies d'ARN viral / μL). Pour chaque espèce hôte, un modèle linéaire a ensuite été ajusté afin de déterminer l'effet de la souche sur la concentration en ARN viral dans les plantes.

III. Résultats

3.1. Capacité des souches PPV-T et PPV-An à infecter des plants de prunier et pêcher

3.1.1. Taux d'infection

Le taux d'infection des plantes a été déterminé au 28^{ème} JPI par le test sérologique DAS-ELISA indépendamment des symptômes. Nous trouvons que le taux d'infection dépend de la souche utilisée ($\chi^2_{ddl=2} = 46,4$; $N = 239$; $P = 8,37e-11$) et de l'espèce hôte ($\chi^2_{ddl=1} = 8,88$; $N = 239$, $P = 0,003$). Les pruniers sont plus susceptibles d'être infectés par le PPV (probabilité d'infection estimée $p = 0,54$, intervalle de confiance 95% [0,45-0,63]) que les pêchers ($p = 0,36$ IC 95 [0,29-0,46]). Sur le prunier, le taux d'infection des plantes par la souche PPV-M ($p = 0,8$; IC 95 [0,64-0,89]) est supérieur à celui des plantes inoculées par les souches PPV-T ($p = 0,47$; IC 95 [0,33-0,63]) et PPV-An ($p = 0,35$; IC 95 [0,22-0,51]). Comme pour le prunier, les pêchers inoculés par la souche PPV-M ont un taux d'infection plus élevé ($p = 0,7$; IC 95 [0,54-0,82]). Seulement 23,07 % des pêchers inoculés sont infectés par PPV-T ($p = 0,23$; IC 95 [0,12-0,39].) et 17,5 % par PPV-An ($p = 0,17$, IC 95 [0,08-0,32]). Il n'existe pas de différence significative entre les taux d'infection des pruniers par les souches PPV-T et PPV-An ($P = 0,25$). De même pour les pêchers, les taux d'infection des plantes par les souches PPV-T et PPV-An sont identiques d'un point de vue statistique ($P = 0,54$) (Figure 10).

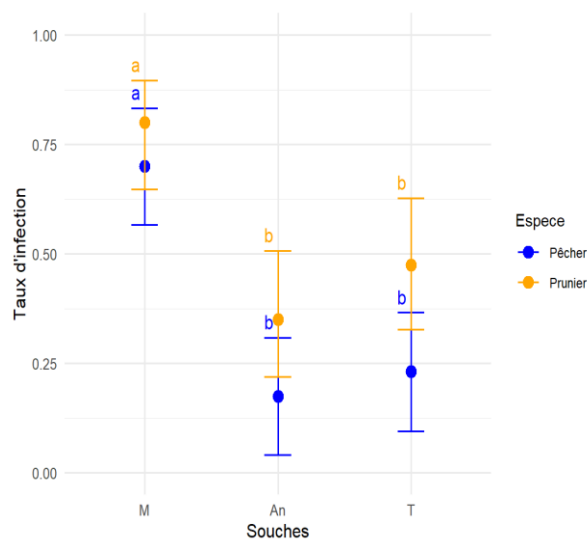


Figure 10 : Taux d'infection des plantes par les souches PPV-M, PPV-T et PPV-An. Les points représentent pour chaque souche la probabilité de transmission prédite par le modèle GLM. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95%. Les lettres a et b indiquent les différences entre taux d'infection au seuil de 5 %.

Sur pêcher comme sur prunier, nous trouvons que le taux d'infection des plantes inoculées par les souches PPV-M et PPV-T dépend de la feuille utilisée comme source d'inoculum (Annexe 3). Cependant, nous ne détectons pas d'effet de la feuille source sur le taux d'infection des plantes par la souche PPV-An, quelle que soit l'espèce hôte (Annexe 3).

Nous avons mesuré la charge virale des feuilles sources et étudié si celle-ci a influencé les taux d'infection que nous avons observé. Pour cela, nous avons fait des régressions logistiques (GLM binomial) entre la réussite à l'infection et la charge virale des feuilles sources. Sur prunier, nos analyses ne permettent pas de mettre en évidence un effet de la charge virale dans les feuilles sources sur la réussite à l'infection ($\chi^2_{ddl=1} = 1,20$; $N = 119$; $P = 0,27$), et ce quelle que soit la souche inoculée. Sur pêcher, nous trouvons un effet de la charge virale dans les feuilles sources sur le taux d'infection ($\chi^2_{ddl=1} = 10,7$; $N = 119$; $P = 0,001$; Figure 11). Pour la souche PPV-M, contrairement à l'attendu, le taux d'infection a été plus faible pour les feuilles sources avec la charge virale la plus importante (ratio de vraisemblance : 0,11 ; IC 95 [0,015-0,59]). Pour la souche PPV-T, nous trouvons un effet positif de la charge virale sur le taux d'infection (ratio de vraisemblance : 5,12 ; IC 95 [1,64-35,76]). Nous n'avons pas détecté d'effet significatif de la charge virale de la souche PPV-An sur son taux d'infection.

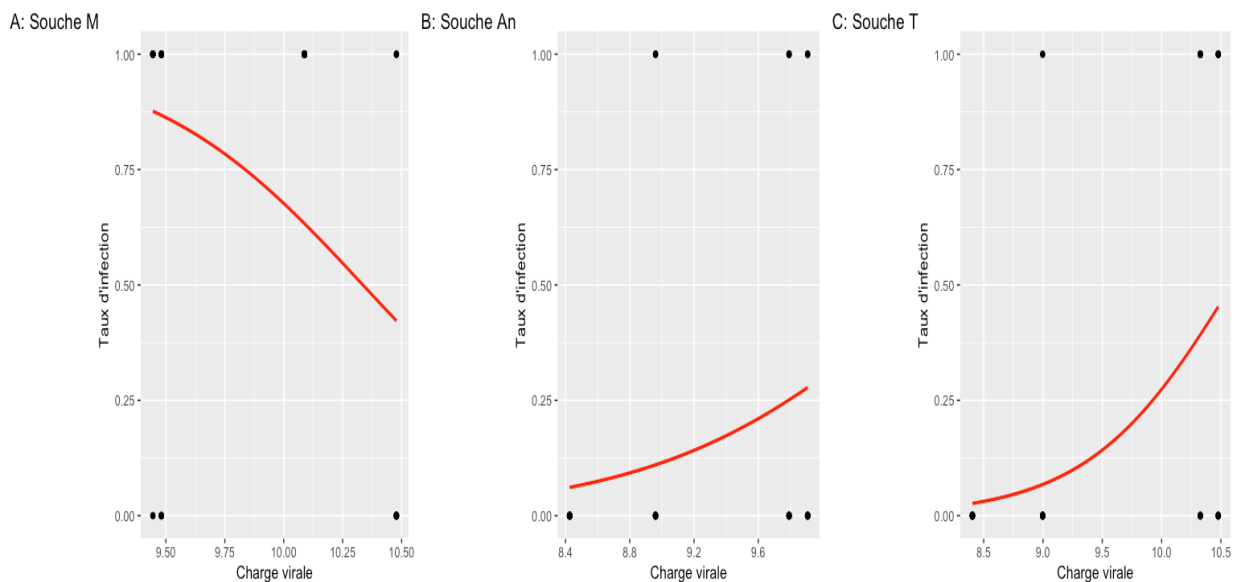


Figure 11 : Effet de l'accumulation virale dans les feuilles sources sur la réussite à l'infection pour chacune des souches sur pêchers. La courbe rouge est la régression logistique du taux d'infection des plantes sur le log nombre de copies d'ARN viral / μL . Les points représentent les données de la réussite à l'infection pour chaque plante inoculée (plusieurs points sont superposés).

3.1.2. Durée d'incubation

Sur prunier, les analyses statistiques ne permettent pas d'identifier de différence entre les dynamiques d'apparition des symptômes des trois souches ($\chi^2_{ddl=2} = 1,6$; $N = 65$; $P = 0,4$). Cependant, nous avons observé que les premiers symptômes apparaissent plus tôt sur les plantes infectées par PPV-M que sur celles infectées par les deux autres souches. Pour les souches PPV-M et PPV-T, 50 % des plantes infectées ont développé des symptômes entre 11 et 15 JPI alors que pour la souche PPV-An, ce n'est qu'à partir du 15^{ème} JPI que les premiers symptômes apparaissent sur la moitié des plantes infectées (Figure 12).

Sur pêcher, la durée d'incubation varie significativement en fonction des souches inoculées ($\chi^2_{ddl=2} = 31,6$; $N = 41$; $P = 1e-07$). Pour la souche PPV-M, 50 % des plantes infectées ont exprimé les premiers symptômes entre 11 et 15 JPI alors que ceux-ci apparaissent entre 15 et 18 JPI pour PPV-T. Les plantes inoculées par la souche PPV-An ont développé des infections asymptomatiques tout au long des observations.

Nous notons également que la dynamique d'apparition des symptômes a été différente selon l'espèce hôte. Sur le prunier, l'apparition des premiers symptômes a été progressive alors que sur le pêcher, la dynamique d'apparition a été assez brusque et synchrone entre les plantes infectées. De plus, nous avons observé que sur pêcher, toutes les plantes infectées étaient symptomatiques après 18 JPI alors que sur prunier, des plantes sont toujours asymptomatiques après 25 JPI (Figure 12).

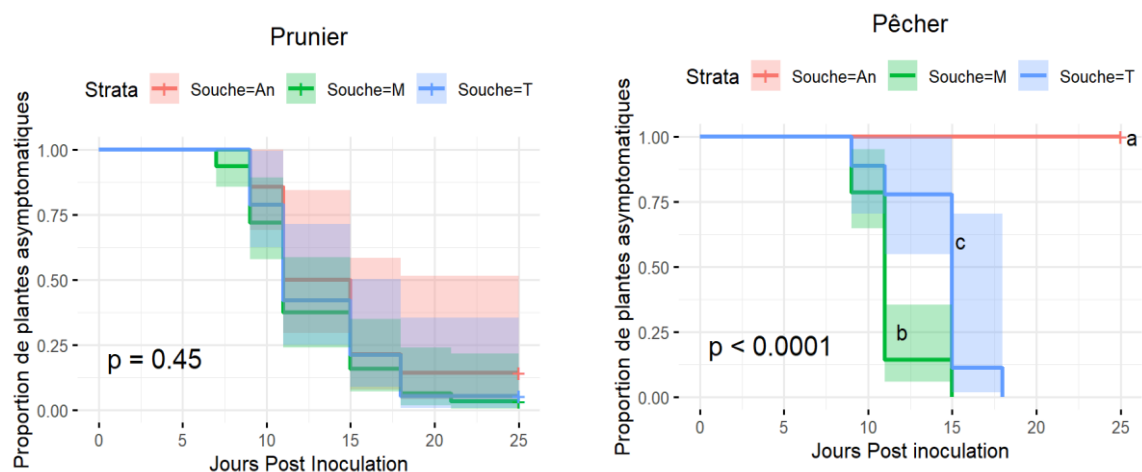


Figure 12 : Durée d'incubation des souches PPV-M, PPV-T et PPV-An sur prunier et pêcher. Les lettres a, b et c indiquent les différences entre les courbes de survie au seuil de 5 %. Les enveloppes colorées autour de chaque courbe représentent les intervalles de confiance à 95 %.

3.1.3. Intensité des symptômes

Sur le prunier, nous ne trouvons pas d'effet significatif de la souche inoculée sur l'intensité des symptômes à 15 JPI ($\chi^2_{ddl=2} = 0,015$; N = 65 ; P = 0,99). Nous trouvons cependant un effet significatif de la souche inoculée au 21^{ème} JPI ($\chi^2_{ddl=2} = 9,04$; N = 65 ; P = 0,01). De plus, des symptômes de niveau 4 ont été enregistrés sur les plantes infectées par PPV-M et PPV-T alors que pour PPV-An, l'intensité maximale était 3 (Figure 13).

Pour le pêcher, nous trouvons un effet significatif de la souche inoculée sur l'intensité des symptômes varie aux deux dates d'observation ($\chi^2_{ddl=2} = 23,51$; N = 44 ; p=7,82e-06 à 15 JPI et $\chi^2_{ddl=2} = 30,84$; N = 44 ; p=2e-07 à 21JPI). Au 21^{ème} JPI, la souche PPV-M est celle qui a provoqué de forts symptômes sur les plants de pêchers infectés. Les symptômes étaient de niveau 3 pour celle-ci contre des symptômes de niveau 1 pour la souche PPV-T (Figure 13).

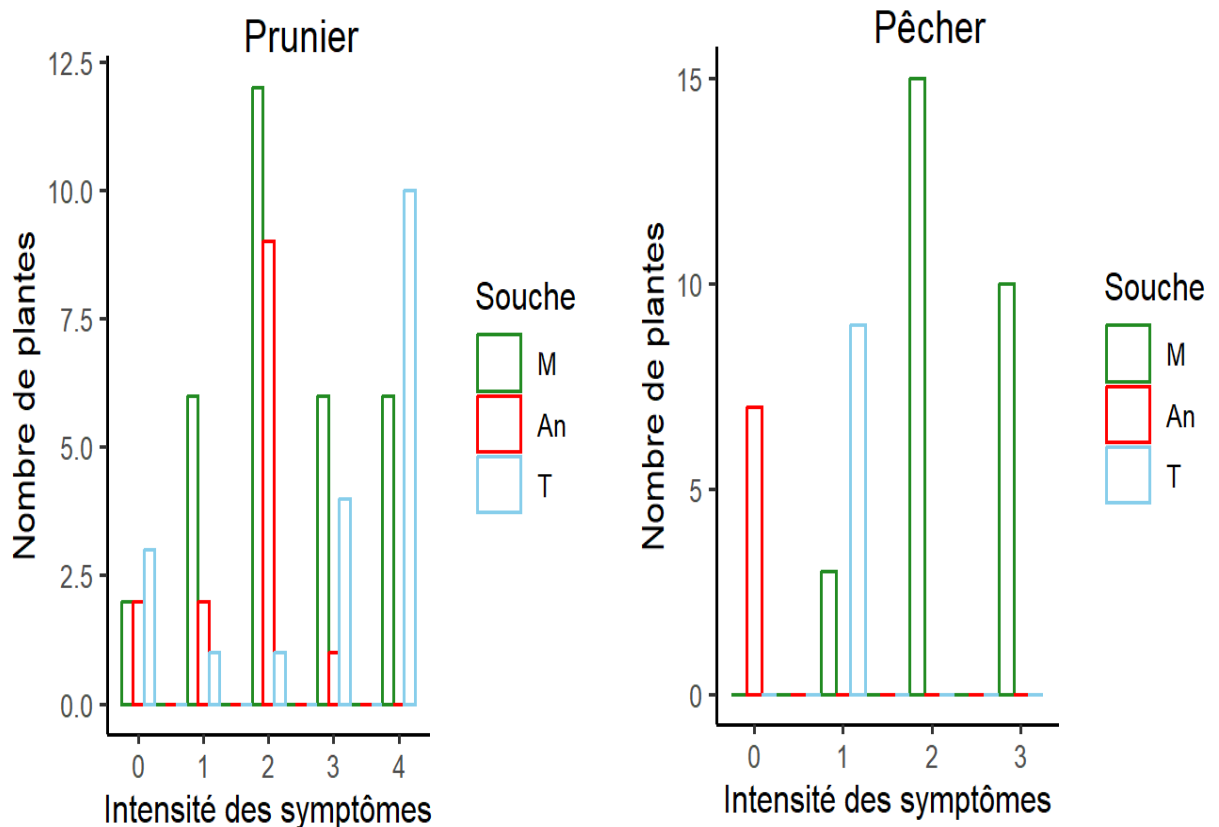


Figure 13 : Histogramme du nombre de plantes qui ont présentées chaque intensité de symptômes à 21 JPI (note entre 0 et 4, voir Annexe 4).

3.1.4. Accumulation virale

Sur les pruniers, nos analyses ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les charges virales des souches PPV-M, PPV-T et PPV-An ($F = 28,88$; $P = 0,16$) (Figure 14).

En revanche, pour le pêcher, nous trouvons un effet significatif de la souche inoculée sur la quantité d'ARN viral dans les plantes infectées ($F = 1,914$; $P = 4,088e-07$). En effet, la quantité d'ARN de la souche PPV-An ($\beta = 9,90$ log copies d'ARN viral / μL ; IC 95 [9,52-10,28]) est beaucoup plus faible que celle des souches PPV-M ($\beta = 11,65$ log nombre de copies d'ARN viral / μL ; IC 95 [10,76-12,55]) et PPV-T ($\beta = 11,44$ log nombre de copies d'ARN viral / μL ; IC 95 [10,54-12,34]) (Figure 14).

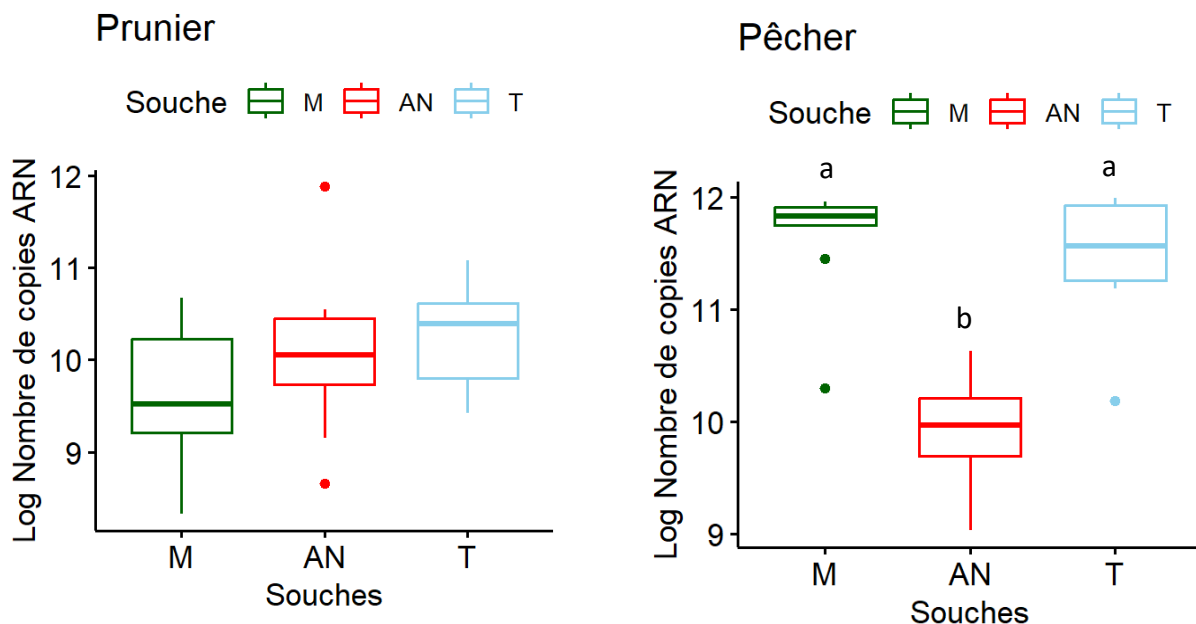


Figure 14 : Accumulation virale dans les plantes infectées. Les lettres a et b représentent les niveaux de significativité au seuil de 5 %.

3.2. Capacité de la souche PPV-T à surinfecter des pruniers initialement infectés par PPV-M

La surinfection par PPV-T des pruniers déjà infectés par PPV-M réduit de moitié le taux d'infection ($p = 0,21$; IC 95[0,12-0,36]) par rapport à une infection simple par PPV-T ($p = 0,47$; IC 95[0,36-0,59]) (Figure 15).

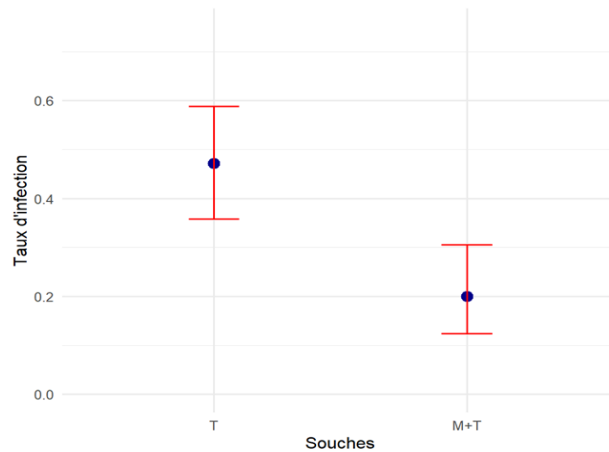


Figure 15 : Taux d'infection par la souche T en infection simple et en infection multiple (PPV-M+T). Les points représentent pour chaque modalité la probabilité de transmission prédite par le modèle GLM. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 95%.

Nous ne trouvons pas de différence significative entre l'intensité des symptômes sur les plantes infectées par PPV-T seule et sur les plantes surinfectées à 15 JPI ($\chi^2_{ddl=1} = 2,17$; $N = 48$ $p = 0,13$). Cependant, nous notons que l'intensité maximale des symptômes est plus faible sur les plantes surinfectées que sur les plantes infectées uniquement par PPV-T. Pour les plantes infectées uniquement par PPV-T, les symptômes ont atteint le niveau 4 dès 15 JPI alors que pour les plantes surinfectées, l'intensité maximale enregistrée est de niveau 3 (Figure 16).

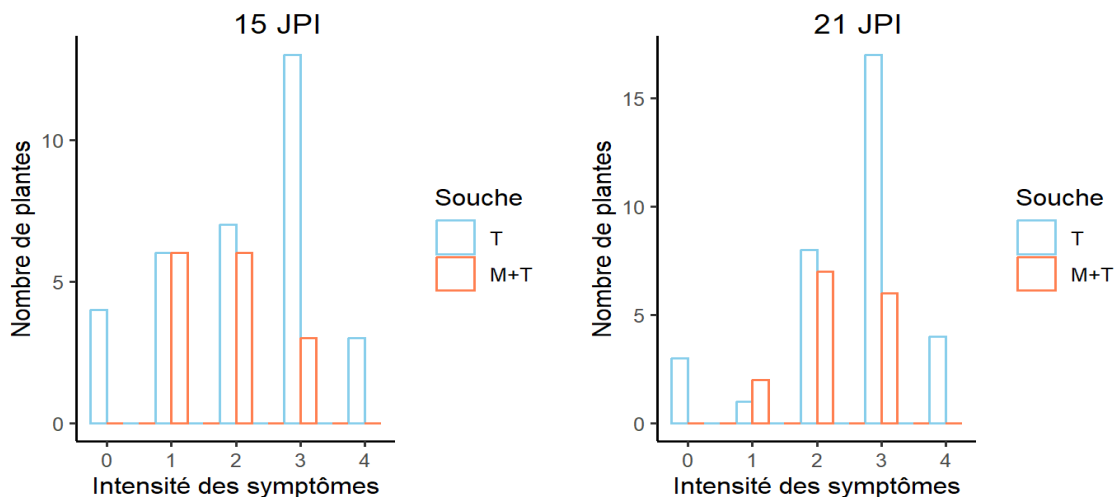


Figure 16 : Intensité des symptômes de la sharka en infection simple par PPV-T et en infection multiple PPV-M+PPV-T à 15 JPI et à 21 JPI. Ici la date d'infection de référence correspond aux infections par PPV-T (c'est-à-dire la date de surinfection).

IV. Discussion

L'objectif global de cette étude était de caractériser les propriétés épidémiques des souches PPV-T et PPV-An sur prunier et sur pêcher puis de les comparer à celles de la souche PPV-M considérée comme la plus épidémique dans les vergers européens (Candresse *et al.*, 1998 ; Labonne & Dallot, 2006). Pour ce travail, nous nous sommes intéressés aux taux d'infection des plantes, à la durée d'incubation, à l'intensité des symptômes sur les plantes infectées et à l'accumulation virale.

Ce travail est le premier qui caractérise le potentiel épidémique des souches PPV-T et PPV-An. De cette étude, il ressort que les espèces cultivées (prunier et pêcher dans notre cas) peuvent être infectées par ces deux souches, mais la probabilité d'infection est significativement plus faible par rapport à PPV-M. Nos résultats ne permettent pas de distinguer des différences significatives dans les taux d'infection causés par PPV-T et PPV-An sur prunier comme sur pêcher, même si les taux d'infection causés par PPV-An ont été plus faibles. En Turquie où PPV-T a été détecté pour la première fois (Serçe *et al.*, 2009), cette souche est essentiellement présente dans des jardins résidentiels où la transmission pourrait être surtout liée aux activités humaines (greffage et échanges de matériel végétal entre particuliers) alors que dans les vergers, c'est la souche PPV-M qui est prévalente (Gürcan & Ceylan, 2016) Nous avons trouvé des résultats contrastés quant à l'effet de la charge virale dans les feuilles source sur le taux d'infection. En effet, les mêmes feuilles sources ont été utilisées pour inoculer les deux espèces hôtes (pruniers et pêchers). Des effets stochastiques liés à la plante hôte (morphologie des feuilles, état physiologique des plantes) et aux pucerons (comportement de piqûre sur les plantes test) pourraient expliquer ce résultat (Hull 2014). Par exemple, les feuilles de pêchers sont étroites mais plus longues que celles des pruniers, ce qui pourrait faciliter la phase d'IAP sur les pêchers et donc une meilleure corrélation charge virale-taux d'infection. D'autre part, nous avons trouvé une corrélation négative entre la charge virale dans les feuilles sources de PPV-M et le taux d'infection de cette souche sur pêchers. Ce résultat contraste avec l'hypothèse que nous avons émise que la réussite à l'infection des plantes inoculées serait positivement corrélée à l'accumulation virale dans les feuilles sources. Ce résultat contraste plus généralement avec les nombreuses études qui documentent une corrélation positive entre la charge virale et le taux de transmission chez les virus. Par exemple, pour le SRAS-CoV-2, le modèle ajusté par Marc *et al.* (2021) prédit que des niveaux de charge virale plus élevés au moment de l'infection pourraient entraîner une augmentation relative de la probabilité de transmission. Cette absence de corrélation entre la charge virale de la souche PPV-M et son taux de transmission sur pêchers

semble être fortement influencée par la feuille F1, qui présentait une forte charge virale mais qui n'a généré qu'un très faible taux d'infection. Cette feuille n'a pas pu être maintenue turgescente lors de la phase d'acquisition du virus par les pucerons ce qui a pu gêner le comportement de piqûre des pucerons. De plus, cela a pu biaiser l'évaluation de la charge virale, la masse de l'échantillon étant prise en compte dans le processus d'extraction de l'ARN. Enfin, seulement quatre feuilles ont été utilisées comme source pour les inoculations ce qui a nécessairement limité la puissance statistique des analyses.

Nos expériences ont permis de mettre en évidence des différences dans la dynamique d'apparition des symptômes entre les espèces hôtes et entre les souches. La date d'apparition des premiers symptômes est similaire sur pruniers et pêchers, mais la dynamique d'apparition des symptômes au sein des plantes hôtes est beaucoup plus rapide sur pêchers que sur pruniers. Sur pruniers, des plantes infectées étaient toujours asymptomatiques à 25 JPI. Même si cette durée est largement suffisante pour observer des symptômes de sharka dans nos conditions expérimentales avec les souches PPV-M, PPV-D et PPV-Rec, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer si des symptômes peuvent apparaître plus tardivement. Il serait donc utile de prolonger la période d'observation pour confirmer ce résultat. Dans les conditions de notre expérimentation, nous n'avons pas pu rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle il n'existe pas de différence de durée d'incubation entre les trois souches, même si les premiers symptômes ont été observés sur les plantes infectées par PPV-M.

Sur pêcher, toutes les infections par PPV-An sont asymptomatiques, contrairement aux infections par PPV-M et PPV-T. Si les infections de PPV-An sur pêchers sont confirmées asymptomatiques, cela pourrait compliquer la gestion des épidémies. En effet, la durée d'incubation du PPV est similaire à sa période de latence, c'est-à-dire que les plantes deviennent infectieuses au moment où elles expriment les premiers symptômes (Rimbaud *et al.*, 2015). Si la durée de latence est synchrone avec la durée d'incubation alors les chances que les pêchers infectés par PPV-An deviennent des plantes sources pour la propagation de la sharka sont très faibles

Nous ne trouvons pas de différence marquante dans l'accumulation virale entre les trois souches, hormis la faible accumulation de la souche PPV-An sur pêcher, un résultat cohérent avec l'absence de symptômes observés pour cette souche sur cette espèce.

Nos résultats suggèrent donc que les différences entre les souches se manifestent principalement sur les taux de transmission. Globalement, l'ensemble de nos résultats indiquent que PPV-M possède des caractéristiques biologiques (taux d'infection élevé et durée d'incubation plus courte) qui peuvent favoriser sa dissémination dans les vergers de pruniers et de pêchers par rapport aux deux autres souches. Ce constat est cohérent avec plusieurs études précédemment publiées (Capote *et al.*, 2010 ; Labonne & Dallot, 2006 ; Schneider *et al.*, 2011). De plus, les pêchers infectés par PPV-M sont de meilleures sources pour la transmission du virus par pucerons comparativement à ceux infectés par PPV-D et PPV-Rec (Borron *et al.*, 2013). Après la souche PPV-M, nos résultats montrent que la souche PPV-T est celle qui présenterait le risque épidémique le plus important. Même si le taux de transmission de PPV-T est plus faible que celui de PPV-M, les deux souches sont similaires pour la plupart des paramètres que nous avons mesuré. Enfin, la souche PPV-An est celle qui présente le risque le plus faible, notamment sur pêchers. Réciproquement, donc, nos résultats suggèrent que si PPV-An et PPV-T peuvent avoir certaines propriétés épidémiologiques similaires à PPV-M (charge virale, durée d'incubation, intensité de symptômes, surtout sur prunier), le risque qu'elles puissent causer des épidémies en vergers serait relativement faible là où PPV-M circule. Nos résultats ne permettent pas cependant d'exclure qu'une évolution des pratiques culturales, des variétés ou encore des conditions environnementales puissent changer ces conclusions. Répondre à ces questions pourrait être l'objet de futures recherches.

Après avoir réalisé cette caractérisation biologique, nous pouvons retenir qu'après PPV-M, la souche PPV-T est celle qui peut provoquer des épidémies sur prunier comme sur pêcher. Il a été démontré que le prunier est capable d'héberger plusieurs souches de PPV (Dallot *et al.*, 2020). Sachant que PPV-M est déjà présente dans les vergers européens, nous avons décidé d'évaluer la capacité de PPV-T à surinfecter des plants de pruniers infectés par PPV-M. Nous avons remarqué que la présence de PPV-M dans les plants a réduit le taux d'infection par PPV-T. Ce résultat suggère une interaction antagoniste entre les deux souches virales que nous ne saurions confirmer à ce stade. Seul le taux d'infection systémique à 28 JPI a été analysé. Pour mieux comprendre l'impact de la surinfection à l'échelle de la plante entière, les feuilles qui ont été directement en contact avec les pucerons virulifères ont été prélevées et seront également testées par la suite en RT-PCR. Pour vérifier si PPV-T est capable de se maintenir dans les plantes déjà infectées par PPV-M, un autre test sera réalisé à 60 JPI. Nous suggérons également que la charge virale de PPV-M et de PPV-T soit quantifiée pour voir l'impact de la surinfection sur l'accumulation de chaque souche dans la plante. Si à l'issue de ces tests, il est confirmé que

la présence des deux souches au sein d'un même prunier aboutit à des interactions antagonistes, les stratégies de gestion de la sharka pourraient être adaptées en fonction de la souche pour laquelle la relation est bénéfique.

Conclusion

La présente étude est la première caractérisation expérimentale des propriétés épidémiques des souches PPV-T et PPV-An. La souche PPV-M a été identifiée comme la plus épidémique sur prunier comme sur pêcher. Sur le pêcher, la souche PPV-An s'accumule moins que les deux autres souches et n'a induit que des infections asymptomatiques. Des prélèvements de matériel végétal sur les pêchers suivis d'analyses moléculaires pourraient être réalisés pour s'assurer du fait que la souche PPV-An ne soit pas déjà présente dans les vergers de pêchers européens. Il faudrait donc développer des outils de diagnostic par PCR spécifique à PPV-An. Ces différents résultats nous permettent de dire que les vergers de pruniers et pêchers peuvent être infectés par les souches PPV-T et PPV-An mais les risques qu'ils induisent des épidémies sont faibles. Les essais d'infection multiples réalisés ont indiqué que la présence de la souche PPV-M réduit la proportion de plantes infectées par rapport à une infection simple par PPV-T. Des expérimentations complémentaires seront réalisées afin de déterminer l'impact des interactions entre ces deux souches sur la propagation de la sharka. Les différentes données épidémiques collectées pendant cette étude vont contribuer à l'amélioration des stratégies de surveillance de la sharka et faciliter la mise en place des méthodes de gestion.

Références bibliographiques

- Anderson, R. M., & May, R. M.,**1992. *Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P.,** 2004. Emerging infectious diseases of plants : Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(10) 535–544). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T., et Cambra, M.** 2011. *Plum pox virus*. In : Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., & Jelkmann, W., (eds). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chap. 36. St. Paul, MN (États-Unis), APS Press. 428 pp.
- Borron, S., Dallot, S., Bonnot, F., Jevremovic, D., Pichaut, J. P., Jacquot, E., & Labonne, G.,** 2013. Combining experimental assays with epidemiological surveys to assess indicators of *Plum pox virus* epidemicity [poster]. In *14e Rencontres de Virologie Végétale*, Aussois, France, Jan. 13–17, Book of Abstracts, p.85
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B., & Dunez, J.,**1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology* 88, 198-204.
- Capote, N., Cambra, M. A., Botella, P., Gorris, M. T., Martínez, M. C., López-Quílez, A., & Cambra, M.,** 2010. Detection, characterization, epidemiology and eradication of *plum pox virus* Marcus type in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 619-628.
- Chirkov, S., Sheveleva, A., Ivanov, P., & Zakubanskiy, A.,** 2018. Analysis of genetic diversity of Russian sour cherry *plum pox virus* isolates provides evidence of a new strain. *Plant Disease*, 102(3), 569–575. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1104-RE>
- Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F., & Firth, A. E.,** 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5897-5902.
- Clark, M. F., & Adams, A.,**1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), 475-483.
- Dallot, S.,** 2019. *Vers une meilleure compréhension de l'histoire évolutive du Plum pox virus*. Données non publiées.
- Dallot, S., Karychev, R., Dolgikh, S., Thébaud, G., Jacquot, E., & Decroocq, V.,** 2019. First report of *plum pox virus* strain w in Kazakhstan, on *Prunus domestica*. *Plant Disease*, 103(10). <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0351-PDN>
- Dallot, S., Kuzmanovska, B., Brevet, M., Rusevski, R., & Thébaud, G.,** 2020. First report of plum pox virus strains M, D, and Rec infecting *Prunus* spp. in the Republic of North Macedonia. *Plant Disease*, 104(1), 296-296.
- Damsteegt, V. D., Scorza, R., Stone, A. L., Schneider, W. L., Webb, K., Demuth, M., & Gildow, F. E.,** 2007. *Prunus* host range of Plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91(1), 18-23.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D.,** 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- Domingo, E.,** 2010. Mechanisms of viral emergence. *Veterinary research*, 41(6).
- Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., & Zhou, X.,** 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, 153(4), 783–821. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0037-6>

- Fried, G., Chauvel, B., Reynaud, P., & Sache, I.,** 2017. Decreases in crop production by non-native weeds, pests, and pathogens. *Impact of biological invasions on ecosystem services*, 83-101.
- García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., & Candresse, T.,** 2014. Plum pox virus and sharka : A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15(3), 226–241. <https://doi.org/10.1111/mpp.12083>
- García, J.A. & Cambra, M.,** 2007. Plum pox virus and sharka disease. *Plant Viruses*, 1, 69–79.
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M.,** 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 157–186. www.annualreviews.org
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M.,** 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology*, 6(4), 225–232. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0142-z>
- Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., & Levy, L.,** 2004. Plum pox in North America : identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94, 868–874.
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajna, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L. & Candresse, T.,** 2011. Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of Plum pox virus. *Phytopathology*, 101, 980–985.
- Gómez, P., Sempere, R., & Aranda, M. A.,** 2012. Pepino mosaic virus and tomato torrado virus : Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean basin. In *Advances in virus research*, Academic Press, 505-532.
- Gürcan, K., & Ceylan, A.,** 2016. Strain identification and sequence variability of plum pox virus in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(5), 746-760.
- Hull, R.,** 2014. *Plant virology*. Academic press.
- James, D., & Varga, A.,** 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174 : evidence of a new strain. *Virus Research*, 110, 143–150.
- Janssen, D., & Ruiz, L.,** 2021. Special issue : “Plant virus epidemiology.” *Plants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061188>
- Jeger, M. J., Seal, S. E., & Van den Bosch, F.,** 2006. Evolutionary Epidemiology of Plant Virus Disease. *Advances in Virus Research*, 67, 163–203. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)67005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)67005-X)
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., Fabian, S.,** 2017. Package ‘survminer’. version 0.4.3. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>.
- Kegler H., & Hartmann W.,** 1998. Present status of controlling conventional strains of *plum pox virus*. In: Hadidi A., Khetarpal R.K. & Koganezawa H., (eds). *Plant Virus Disease Control*, St. Paul Minnesota: Phytopathological Society, 616–628.
- Kerlan, C. & Dunez, J.,** 1979. Différenciation biologique et sérologique des souches du virus de la sharka. *American Phytopathology*. 11, 241–250
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., ... & Candresse, T.,** 2002. Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV Most. *Phytopathology*, 92(5), 563-572.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J.B., Avinent, L., & Llacer, G.,** 1995. Aphids as potential vectors of *plum pox virus* : comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *ISHS Acta Horticulturae : XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases*, 386, 207–218 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.386.27>.
- Labonne, G., & Dallot, S.,** 2006. Epidemiology of sharka disease in France. *Bulletin OEPP*, 36, 267–270.

- Marc, A., Kerioui, M., Blanquart, F., Bertrand, J., Mitja, O., Corbacho-Monné, M., ... & Guedj, J.,** 2021. Quantifying the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectiousness. *Elife*, 10, e69302.
- Mavrodieva, V., James, D., Williams, K., Negi, S., Varga, A., Mock, R. and Levy, L.,** 2013. Molecular analysis of a Plum pox virus W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate. *Plant Disease*. 97, 44–52.
- Milošević T., Milošević N., Mladenović J., & Jevremović D.,** 2019. Impact of Sharka disease on tree growth, productivity and fruit quality of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Scientia Horticulturae*, 244, 270-276.
- Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation,** 2021. *Arrêté du 9 juillet 2021 relatif à la lutte contre le Plum pox virus, agent causal de la maladie de la sharka*. Journal officiel électronique authentifié n° 0163 du 16/07/2021.
- Mitra, D.,** 2021. Emerging plant diseases: research status and challenges. *Emerging trends in plant pathology*, 1-17.
- Moreno, A. B., & López-Moya, J. J.,** 2020. When viruses play team sports : Mixed infections in plants. *Phytopathology*, 110(1), 29-48.
- Oerke, E. C.,** 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M., & Cambra, M.,** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128(1-2), 151-155.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E., & Cambra, M.,** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. In *Biotechnology and plant disease management*, Wallingford UK : CAB International, 227-249.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. & Candresse, T.,** 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. In : *22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*, 3–8 juin, Rome, Book of Abstracts, p.33.
- Palmisano, F., Minafra, A., Myrta, A., & Boscia, D.,** 2015. First report of Plum pox virus strain PPV-T in Albania. *Journal of Plant Pathology*, 97(2).
- Pérefarres, F., Thébaud, G., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Rimbaud, L., Hoareau, M., Reynaud, B., & Lett, J. M.,** 2014. Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1781). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3374>
- Revers, F., & García, J. A.,** 2015. Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research*, 92, 101–199. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.006>
- Rimbaud, L., Dallot, S., Gottwald, T., Decroocq, V., Jacquot, E., Soubeyrand, S., & Thébaud, G.,** 2015 a. Sharka Epidemiology and Worldwide Management Strategies: Learning Lessons to Optimize Disease Control in Perennial Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 357–378. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120140>
- Rimbaud, L., Dallot, S., Delaunay, A., Borron, S., Soubeyrand, S., Thébaud, G., & Jacquot, E.,** 2015 b. Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: The case of sharka. *Phytopathology*, 105(11), 1408-1416.
- Rizzo, D., Da Lio, D., Panattoni, A., Salemi, C., Cappellini, G., Bartolini, L., & Parrella, G.,** 2021. Rapid and sensitive detection of tomato brown rugose fruit virus in tomato and pepper seeds by reverse

transcription loop-mediated isothermal amplification assays (real time and visual) and comparison with RT-PCR end-point and RT-qPCR methods. *Frontiers in microbiology*, 12, 640932.

Rojas, M. R., & Gilbertson, R. L., 2008. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. *Plant virus evolution*, 27-51.

Roossinck, M. J., 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Reviews of Phytopathology*, 35, 191–209. www.annualreviews.org

Roossinck M. J., 2011 The good viruses : viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 99-108.

Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., Van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, 37(6), e45-e45.

Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W. & Turina, M., 2016 A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, 161, 503–506.

Schneider, W. L., Damsteegt, V., D., Gildow, F. E., Stone, A. L., Sherman, D. J., Levy, L., E., Mavrodieva, V., Richwine, N., Welliver, R., & Luster, D., G., 2011. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *plum pox virus*. *Phytopathology*, 101, 627–36

Serçe, Ç. U., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., & Çağlayan, K., 2009. Further characterization of a new recombinant group of *plum pox virus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142 (1-2), 121-126.

Sheveleva, A., Ivanov, P., Prihodko, Y., James, D. & Chirkov, S., 2012 Occurrence and genetic diversity of Winona-like *plum pox virus* isolates in Russia. *Plant Disease*. 96,1135–1142.

Syller, J., 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology*, 13(2), 204-216.

Syller, J., 2020. Interspecific and intraspecific interactions among plant viruses in mixed infections. *Applied Plant Virology : Advances, Detection, and Antiviral Strategies*, 437–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818654-1.00030-X>

Therneau, T., 2015. A package for survival analysis in S. *R package version*, 2(7), 2014.

Tollenaere, C., Susi, H., & Laine, A. L., 2016. Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in plant science*, 21(1), 80-90.

Urbino, C., Gutiérrez, S., Antolik, A., Bouazza, N., Doumayrou, J., Granier, M., Darren, P., M. & Peterschmitt, M., 2013. Within-host dynamics of the emergence of tomato yellow leaf curl virus recombinants. *PLoS One*, 8(3), e58375.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., & Dunez, J., 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological methods*, 39(1-2), 27-37.

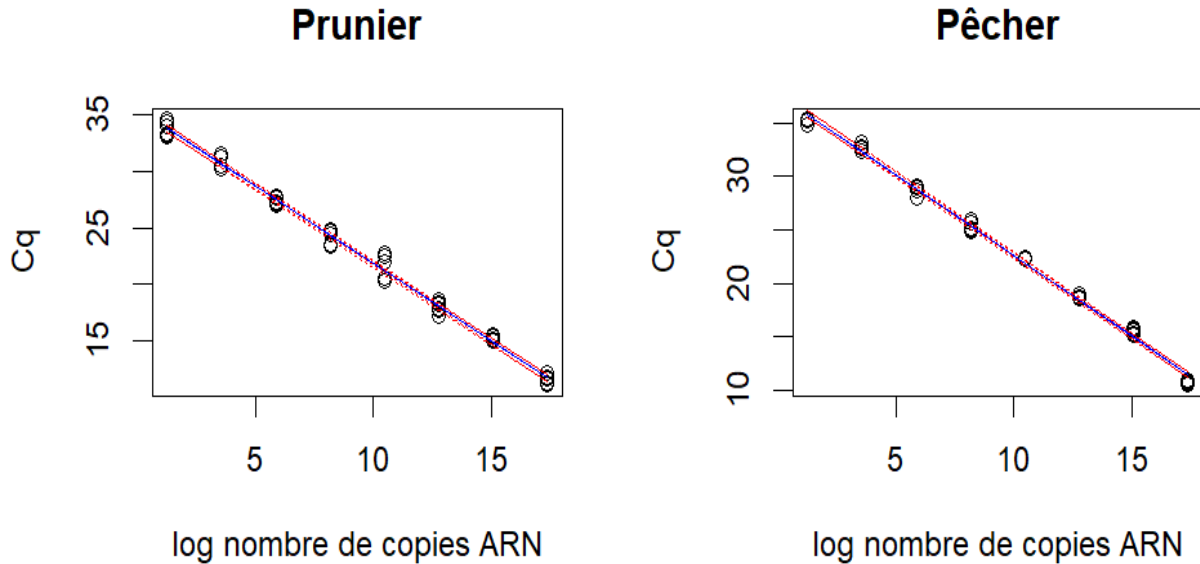
Yadav, N., & Khurana, S. M. P., 2015. Plant virus detection and diagnosis : Progress and challenges. *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*, 97–132. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2610-9_7

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'extraction des ARN avec le RNeasy plant mini kit (ANSES/LSV/MA 043 - Version 2, Décembre 2018)

1. Dans un microtube, placer 200 μL de broyat et ajouter 350 μL de tampon RLT. Bien homogénéiser.
2. Déposer les 550 μL du mélange RLT/broyat sur la colonne QIAShredder (violette) posée sur le microtube fourni.
3. Centrifuger environ 2 minutes à environ 8 000 g.
4. Jeter la colonne QIAShredder. Transférer le filtrat (environ 500 μL) dans un microtube contenant 250 μL d'éthanol absolu (min 95% (v/v)) en veillant à ne pas reprendre le culot de débris cellulaires et homogénéiser par aspirations/ refoulements.
5. Transférer le mélange sur la colonne RNeasy (rose) posée sur le microtube collecteur fourni.
6. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
7. Jeter le filtrat et replacer la colonne RNeasy sur un nouveau microtube collecteur.
8. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 700 μL de tampon RW1.
9. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
10. Jeter le filtrat et replacer la colonne RNeasy sur un nouveau microtube collecteur.
11. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 500 μL de tampon RPE.
12. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
13. Jeter le filtrat et replacer sur un nouveau microtube collecteur.
14. Laver la colonne RNeasy en ajoutant 500 μL de tampon RPE.
15. Centrifuger environ 2 minutes à environ 8 000 g.
16. Jeter le filtrat et le microtube collecteur.
17. Placer la colonne RNeasy sur le microtube de 1,5 mL fourni.
18. Eluer l'ARN avec 50 μL d'eau de qualité « biologie moléculaire ».
19. Centrifuger environ 1 minute à environ 8 000 g.
20. Jeter la colonne RNeasy et conserver l'extrait d'ARN en attente de son utilisation.

Annexe 2 : Gamme-étalon utilisée pour la RT-qPCR basée la courbe standard obtenue avec trois répétitions de dilutions en série 10 fois des ARN transcrits du PPV.



La droite pleine en bleu représente le modèle linéaire ajusté aux données. L'intervalle de confiance est représenté par les traits discontinus rouge à 95 %. La gamme-étalon a été obtenue pour chaque espèce hôte à partir de la transcription *in vitro* d'un amplicon de 356 nucléotides cloné dans un plasmide. Le nombre de copies d'ARN/ μL dans le stock de transcrits était de $5,70\text{E}\pm 12$.

La régression linéaire effectuée sur les seuils de cycle PCR (Cq) et le logarithme du nombre de copies d'ARN viral des gammes-étalon indiquent que les modèles sont très bien ajustés pour le prunier ($R^2 = 0,9935$; $p < 2.2\text{e-}16$) et pour le pêcher ($R^2=0.9947$; $p < 2.2\text{e-}16$).

Annexe 3 : Test du rapport de vraisemblance entre le modèle nul et le modèle intégrant l'effet de la feuille source sur la réussite à l'infection des plantes inoculées.

	Prunier			Pêcher		
	χ^2	ddl	p	χ^2	ddl	p
PPV-M	16.56	3	0.0008	20.14	3	0.0001
PPV-T	15.37	3	0.001	9.80	3	0.02
PPV-An	3.89	3	0.27	4.86	3	0.18

Annexe 4 : Grille de notation des symptômes du *plum pox virus* sur pruniers et pêchers

Stade 0 : Aucun dégât



Stade 1 : symptômes très légers, taches chlorotiques autour des nervures secondaires des feuilles. En général, une seule feuille présente les symptômes sur la plante. Pour le pêcher, on observe un début d'éclaircissement localisé des nervures secondaires ou de petits points chlorotiques sur environ 30% de la surface de la feuille.



Stade 2 : symptômes bien visibles, mosaïques étendues à plus de 50% de la surface du limbe. Pas de déformations foliaires. Pour les pêchers, on observe un éclaircissement des nervures secondaire et des points chlorotiques sur environ 50% ou plus de la surface foliaire. Pas de déformations à ce stade.



Stade 3 : Mosaïques étendues à l'ensemble de la feuille, éclaircissement des nervures, crispations et début de déformations de la feuille. Pour les pêchers, on observe un éclaircissement des nervures secondaires et tertiaires beaucoup plus prononcé et sur la quasi-totalité de la feuille.



Stade 4 : Déformations violentes des limbes foliaires, crispations empêchant le développement normal des feuilles. Possibles cas de nécroses.

NB : La note correspond au stade le plus élevé observé sur la plante (en regardant l'ensemble des feuilles symptomatiques).