

Analyse de la durabilité de résistances au virus de la jaunisse nanisante de l'orge

Emmanuel JACQUOT*¹, Agnès DELAUNAY¹, Stéphanie MORLIÈRE¹, Florian CHAIN¹, Gérard RIAULT¹, Maxime TROTTE², Stephen SUNDERWIRTH³,

* **Coordinateur** : Emmanuel JACQUOT, emmanuel.jacquot@rennes.inra.fr, Tél. : 02 23 48 58 17

1 - INRA, Agrocampus Rennes, UMR1099 BiO3P (Biology of Organisms and Populations applied to Plant Protection) BP 35327, 35653 Le Rheu

2 - INRA, Agrocampus-Rennes, UMR118 APBV (Plant Breeding and Biotechnology) - BP 35327, 35653 Le Rheu

3 - CETAC - Secobra Recherches, Centre de Bois Henry, 78580 Maule

Ce programme de recherche, impliquant les UMRs BiO3P et APBV de l'INRA de Rennes-Le Rheu et le CETAC, a été initié en juin 2004 par la mise en place de procédures d'entretien d'isolats du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (*Barley yellow dwarf virus*-PAV, BYDV-PAV) sur hôtes différentiels (entretiens alternatifs) et par la conception d'un dispositif expérimental pour les essais en plein champ.

Processus d'adaptation d'un isolat à son hôte : durabilité d'une source de résistance

Le génome des phytovirus à ARN est répliqué grâce à l'action d'une ARN polymérase d'origine virale. Cette enzyme, peu fidèle car dépourvue de système de correction est à l'origine de l'introduction d'erreurs (mutations, recombinaisons, insertions et/ou délétions) dans les molécules néo-synthétisées. Du fait de la nature simple brin de leur génome, les modifications nucléotidiques ainsi introduites constituent des mutations directes de l'information génétique virale. Associé aux temps de générations très courts de leur cycle biologique et à la taille réduite de leur génome, ce processus de réplication peu fidèle augmente le potentiel de diversification génétique des génomes viraux au niveau même de l'individu infecté. Cette caractéristique permet aux populations virales d'évoluer très rapidement. Cependant, les contraintes associées à l'organisation complexe des génomes viraux et au statut de parasite obligatoire de ces micro-organismes réduisent l'espace moléculaire de la variabilité génétique des entités virales infectieuses. Ainsi, tous les variants d'une population virale sont continuellement soumis au processus de diversification, de compétition et de sélection. Par conséquence, les hôtes infectés hébergent une collection de variants dérivant plus ou moins directement des molécules d'ARN virales inoculées. Ces variants possèdent potentiellement une valeur adaptative différente de celle de leur(s) molécule(s) matrice(s). L'évolution virale, conséquence des réponses des populations de pathogènes aux différentes pressions de l'hôte et de l'environnement, se traduit par la sélection continue des entités les plus adaptées. Ce processus de sélection/adaptation, décrit pour des modèles viraux animaux, bactériens et végétaux, peut être étudié en suivant la modification des propriétés biologiques d'un isolat au cours de passages en série (Serial Passage Experiment, SPE) de la population virale sur un hôte résistant.

Les travaux effectués sur la JNO depuis sa première caractérisation en 1951 ont décrit la variabilité biologique (gamme d'hôtes, mode de transmission) et moléculaire (séquences, cadres ouverts de lecture) de ces phytovirus.

Toutefois les connaissances disponibles sur la variabilité moléculaire du BYDV-PAV se rapportent à des descriptions et comparaisons de données moléculaires (séquences, profils de restriction) d'isolats possédant des origines géographiques et biologiques (plantes hôtes) distinctes. A partir de ces informations, il est difficile d'évaluer précisément l'impact de la plante sur la diversité des populations virales et sur leur évolution.

Dans ce contexte, le potentiel de deux sources de résistance en cours d'introggression chez le blé et leur impact sur l'évolution d'isolats du BYDV-PAV (contournement de résistance, gain de virulence et d'agressivité) a été étudié. Ainsi, l'utilisation de protocoles d'inoculations standardisés développés au laboratoire a révélé que la lignée résistante de blé "TC14" limite l'accumulation virale au cours des 21 premiers jours de l'infection et retarde la systémie du virus dans la plante infectée. Ces données illustrent la qualité de cette source de résistance portée par la lignée "TC14". Cependant, la réalisation de SPE (en simulation de monocultures intensives) d'un isolat de BYDV-PAV sur cette lignée conduit après quelques passages à la sélection de variants viraux plus virulents contournant la résistance de la plante hôte. Cette forte virulence, observée au laboratoire en conditions contrôlées, est associée à une agressivité plus importante validée par l'intermédiaire d'expérimentations en champ. Ainsi, des composantes du rendement (nombre de grains/m² et poids de 1000 grains) sont plus fortement réduites par l'isolat issu des SPE sur "TC14" que par l'isolat d'origine n'ayant jamais rencontré la source de résistance. Ces résultats, illustrant le potentiel d'adaptation du BYDV-PAV aux pressions de sélections imposées par la lignée "TC14", sont en défaveur de la durabilité des résistances de cette lignée.

Compte tenu de la rareté des sources de résistance au BYDV, il convient de caractériser au mieux ces résistances et le processus d'adaptation décrit lors de ces expérimentations avant de définitivement rejeter la lignée "TC14" des programmes d'amélioration génétique du blé. Ainsi, en complément des études biologiques (cinétiques d'infections) conduites sur les isolats de BYDV-PAV générés au cours des entretiens intensifs sur hôtes résistants, une analyse moléculaire a été entreprise. Pour décrire la structure des populations virales de BYDV-PAV manipulées, une approche par SSCP (analyse de conformation polymorphique de fragments d'acides nucléiques simple brin) a été développée. Le génome viral a été divisé, de l'extrémité 5'-terminale à l'extrémité 3'-terminale, en régions de 500 bases en utilisant deux échelles chevauchantes. Chaque région du génome ainsi définie a

été analysée selon un protocole SSCP standardisé permettant de générer des profils électrophorétiques dont le nombre et l'intensité des bandes observées reflètent une image de la structure de la population virale étudiée. L'influence de l'hôte (espèce, génotype ou résistance) sur la structure des populations virales a été estimée en s'appuyant sur le polymorphisme des profils obtenus à partir d'isolats issus du laboratoire (collection d'isolats viraux provenant du Canada, des USA, du Mexique, d'Angleterre et de France) entretenus depuis plusieurs années de manière exclusive sur un hôte sensible (Orge cv. *Express*) ou issus de protocoles d'entretien sur hôte résistant. Les résultats obtenus révèlent (1) une absence de polymorphisme pour les isolats de la collection du laboratoire quelles que soient leurs caractéristiques (hôte, lieu et date de collection) et (2) l'existence d'une relation "profil SSCP/hôte" pour les isolats issus de l'entretien sur hôtes résistants. Ces résultats soulèvent des questions sur les conséquences des procédures d'entretien au laboratoire de collections de virus sur plante, puisque l'utilisation d'un hôte commun semble conduire à l'homogénéisation des populations virales en collection. Cependant, l'adaptation moléculaire d'une population virale à l'hôte dans lequel elle est générée (observé dans le cas de l'entretien sur un nouvel hôte) permet d'étudier la dynamique de l'adaptation du BYDV-PAV à la source de résistance en cours d'introgession ("TC14"). Ainsi, la région 1500-2000, localisée dans le cadre ouvert de lecture correspondant à la polymérase virale, est associée à un profil SSCP présentant deux bandes spécifiques des populations virales issues de l'entretien sur blé "TC14" ou sur orge cv. *Express*. La quantification de ces bandes après intégration des profils SSCP permet de définir un facteur R reflétant la proportion d'entités moléculaires virales de type "TC14" au sein de la population analysée. Ce rapport tend vers 1 pour une population adaptée à l'hôte résistant.

Le processus d'adaptation de l'isolat BYDV-PAV aux lignées résistantes, tel qu'il a été défini dans le dispositif expérimental mis en place pour étudier l'adaptation aux sources de résistance "TC14" et "Zhong", ne prend pas en compte les alternances d'hôtes indispensables dans la nature pour assurer le maintien des isolats viraux en période d'inter-cultures. Ainsi, en conditions contrôlées, l'adaptation de l'isolat viral à la pression imposée par la plante résistante peut se réaliser aux dépens de sa valeur adaptative ("fitness"). Dans des conditions plus proches du cycle biologique naturel, l'isolat virulent (sélectionné par la plante résistante) pourrait alors être contre-sélectionné lors de passages sur hôtes relais sensibles. Afin de tester cette hypothèse, des protocoles d'entretien impliquant différentes

alternances d'hôtes sensibles et résistants ont été réalisés. Les caractéristiques biologiques et moléculaires des populations virales ont été évaluées régulièrement au cours de ces procédures d'entretien. Une analyse conjointe des données collectées (aire sous la courbe du pourcentage d'infection (AUPPC) et facteur R) a révélé l'existence d'une corrélation significative entre ces deux variables. De plus, une analyse statistique de ce jeu de données a permis de démontrer que les populations virales présentant une valeur R inférieure à 0.5 sont significativement moins virulentes. Ces résultats valident la possibilité d'utiliser l'approche moléculaire pour décrire la virulence (efficacité d'infection) des isolats de BYDV-PAV sur la lignée "TC14" et permettent d'étudier les conditions requises pour qu'un isolat ne dépasse pas le seuil de virulence ($R=0.5$) dans un dispositif utilisant "TC14" comme source de résistance.

Ainsi, les paramètres cinétiques de l'adaptation du BYDV-PAV à la lignée "TC14" ont été estimés en exploitant les données provenant de plusieurs SPEs indépendants. Après trois passages successifs de l'isolat '4E' sur l'hôte résistant, la population virale obtenue est majoritairement constituée d'entités moléculaires "adaptées". Le facteur R associé ($R=0.63 \pm 0.1$), supérieur au seuil défini, confirme l'augmentation rapide de virulence produite après infections successives de la lignée "TC14". Contrairement au processus d'adaptation à l'hôte résistant, le passage successif d'un isolat présentant un facteur R élevé (isolat '4T') sur un hôte sensible (orge cv. *Express*) ne modifie pas significativement la valeur R de la population virale, cette dernière reste virulente ($R = \pm 0.8$). Cependant, lorsque des alternances d'hôtes sont utilisées dans les protocoles d'entretien pour l'isolat '4E' ($R=0.16 \pm 0.03$), les populations virales générées conservent, après au moins 8 passages, une virulence atténuée ($R<0.5$).

Les sources de résistance contre le BYDV-PAV portées par les lignées de blé "Zhong" et "TC14" imposent une pression de sélection qui conduit l'isolat de BYDV-PAV à accroître rapidement sa virulence et son agressivité. Ce processus d'adaptation n'est pas réversible. Cependant, dans un contexte d'utilisation discontinue de la résistance, la dynamique d'adaptation est atténuée. Compte tenu de la rareté des sources de résistance au BYDV-PAV chez le blé, ce résultat doit être pris en compte pour définir les conditions avec lesquelles ces résistances pourront être utilisées dans les programmes d'amélioration du blé afin d'éviter la création d'un environnement génétique favorable à l'émergence de variants virulent et/ou agressifs du BYDV-PAV. Enfin, une des perspectives ouvertes par ce programme consiste à envisager le cumul de ces deux sources de résistance dans un même fond génétique.