



HAL
open science

Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de Baculovirus dans les conditions de protection des cultures.

Benoît Graillot

► To cite this version:

Benoît Graillot. Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de Baculovirus dans les conditions de protection des cultures.. Sciences de la Terre. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2015. Français. NNT : 2015EMSE0782 . tel-02918157

HAL Id: tel-02918157

<https://theses.hal.science/tel-02918157>

Submitted on 20 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



NNT : 2015 EMSE 0782

THÈSE

Présentée par

Benoît GRAILLOT

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Sciences et Génie de l'Environnement

Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de baculovirus dans
les conditions de protection des cultures fruitières.

Soutenue à Alès, le 17 Avril 2015

Membres du jury

Président :

Rapporteurs : Primitivo CABALLERO Pr. Universidad Pública de Navarra. Pamplona,
Espagne.

Elisabeth HERNIOU CR. CNRS/Université de Tours.

Examineurs : Marc BARDIN CR. INRA, Avignon.

Thierry DUPRESSOIR DE. EPHE, Montpellier.

Directeurs de thèse : Miguel LOPEZ-FERBER Pr. École des Mines d'Alès.

Didier GRAILLOT DR. École des Mines de Saint Etienne.

Invités : Samantha BESSE Ingénieur R&D. Natural Plant Protection, Pau.

Myriam SIEGWART IE. INRA, Avignon.

Spécialités doctorales	Responsables :	Spécialités doctorales	Responsables
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	K. Wolski Directeur de recherche	MATHEMATIQUES APPLIQUEES	O. Roustant, Maître-assistant
MECANIQUE ET INGENIERIE	S. Drapier, professeur	INFORMATIQUE	O. Boissier, Professeur
GENIE DES PROCEDES	F. Gruy, Maître de recherche	IMAGE, VISION, SIGNAL	JC. Pinoli, Professeur
SCIENCES DE LA TERRE	B. Guy, Directeur de recherche	GENIE INDUSTRIEL	A. Dolgui, Professeur
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	D. Graillot, Directeur de recherche	MICROELECTRONIQUE	S. Dauzere Peres, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

ABSI	Nabil	CR	Génie industriel	CMP
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BERGER DOUCE	Sandrine	PR2	Sciences de gestion	FAYOL
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean Pierre	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaid	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
BURLAT	Patrick	PR1	Génie Industriel	FAYOL
COURNIL	Michel	PR0	Génie des Procédés	DIR
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR0	Génie Industriel	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FEVOTTE	Gilles	PR1	Génie des Procédés	SPIN
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
LI	Jean-Michel		Microélectronique	CMP
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MAURINE	Philippe			CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MONTHEILLET	Frank	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche		CMP
NORTIER	Patrice	PR1		SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno	Ingénieur de recherche		CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Génie industriel	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
ROUX	Christian	PR	Image Vision Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

ENISE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

BERGHEAU	Jean-Michel	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
BERTRAND	Philippe	MCF	Génie des procédés	ENISE
DUBUJET	Philippe	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FEULVARCH	Eric	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
FORTUNIER	Roland	PR	Sciences et Génie des matériaux	ENISE
GUSSAROV	Andrey	Enseignant contractuel	Génie des procédés	ENISE
HAMDI	Hédi	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
LYONNET	Patrick	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
RECH	Joël	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
SMUROV	Igor	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
TOSCANO	Rosario	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
ZAHOUANI	Hassan	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE

Remerciements

Mes remerciements vont vers tous ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail ou qui ont accepté de le juger.

Merci à Didier Graillot de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne pour avoir accepté la codirection de cette thèse.

A Miguel, merci de m'avoir apporté ta confiance, ton expérience et ta large maîtrise du sujet et de m'avoir permis de coévoluer pendant trois ans au sein du LGEI. J'ai appris énormément grâce à toi et tu as su réorganiser mes pensées à chaque fois que j'en ai eu besoin malgré ton manque de temps.

Tous les membres de l'entreprise NPP, avec à l'origine Antoine Bonhomme à sa tête, et en particulier Samantha Besse pour son implication dans le bon déroulement de la thèse ainsi que Caroline Saubanère et Ghislain Cabrol pour le temps qu'ils ont dû consacrer aux comptages des virus.

Le personnel du LGEI et plus particulièrement les membres de l'équipe ESAH, les secrétaires Catherine Balieu et Andrée Terras. Un merci tout spécial à Sandrine Bayle, Stéphane Cariou et Guillaume Junqua pour les difficiles moments d'étude comparée des bières de différentes origines.

L'INRA d'Avignon en la personne de Myriam Siegwart pour son implication dans le projet PURE, le transfert des insectes et l'accès à la plateforme de séquençage de l'INRA.

Les rapporteurs qui ont accepté de juger ce travail : le Pr. Primitivo Caballero de l'Université de Navarre et le Dr. Elisabeth Herniou de l'Université de Tours ainsi que les membres du jury : le Dr. Marc Bardin de l'INRA d'Avignon et le Pr. Thierry Dupressoir de l'EPHE de Montpellier.

A nos stagiaires qui ont abattu un énorme boulot en peu de temps: Hayden, Athina, Jean et Hawraa et aussi à Guilhem même si il n'était pas sur les mêmes thématiques.

Merci Sandrine pour ton aide précieuse sur la PCR quantitative et pour tous les coups de pouce toujours dans la bonne humeur !

Je pense que le plus gros merci va à Christine sans qui les résultats de cette thèse n'auraient jamais existé. Merci de m'avoir tout appris sur les élevages, les tests bios, le système D et les méthodes pifométriques toujours dans la bonne humeur. Je n'aurais jamais cru que le travail de labo de cette thèse puisse être aussi plaisant. Pour le seul plaisir de continuer à travailler en ta compagnie je resignerais sans hésiter pour 3 ans !

Mes parents qui m'ont toujours soutenu dans les bon et mauvais moments de ces longues études et qui étrangement y ont toujours cru.

Enfin, à Clémence qui me supporte depuis presque 10 ans et sans qui j'aurais sûrement baissé les bras depuis longtemps. Merci pour ton soutien et pour l'amour que tu me portes. Ce manuscrit t'est dédié. Je t'aime.

Publications et présentations

Brevet :

Un mélange de génotypes de CpGV adapté à la tordeuse orientale et son utilisation pour contrôler les dégâts de cet insecte. **(En cours de dépôt)**

Publications :

Articles :

Graillot, B., Besse, S., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. & López-Ferber, M. (2013). Sequence analysis of CpGV-R5 isolate able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome. *Insect pathogens and entomoparasitic nematodes, IOBC-WRPS Bulletin*, **90**, 195-199.

Graillot, B., Blachère-Lopez, C., Besse, S., Siegwart, M. & López-Ferber, M. (2013). Variation in the susceptibility to CpGV in population of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Insect pathogens and entomoparasitic nematodes, IOBC-WRPS Bulletin*, **90**, 149-153.

Graillot, B., Berling, M., Blachère-López, C., Siegwart, M., Besse, S. & López-Ferber, M. (2014). Progressive adaptation of a CpGV isolate to codling moth populations resistant to CpGV-M. *Viruses*, **6**, 5135-5144.

Graillot, B., Bayle, S., Blachère-López, C., Besse, S., Siegwart, M. & López-Ferber, M. (2015). Biological characteristics of experimental CpGV mixed genotype isolates: ability to control susceptible and resistant host populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **(Soumis)**

Graillot, B., Palma, L., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. Besse, S. & López-Ferber, M. Detecting positively selected genes between CpGV isolates. **(En cours de préparation)**

Graillot, B., Bayle, S., Besse, S., Blachère Lopez, C., Siegwart, M. & López-Ferber, M. Successive passages of mixed CpGV populations converge to an optimal efficacy. **(En cours de préparation)**

Graillot, B., Besse, S., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. & López-Ferber, M. Host range extension of CpGV: adaptation to Oriental Fruit Moth, *Cydia molesta*. **(En cours de préparation)**

Graillot, B., Bayle, S., Besse, S., Blachère López, C., Siegwart, M. & López-Ferber, M. Generalized recombination upon mixed infections contributes to genotypic variability in CpGV isolates. **(En cours de préparation)**

Review :

Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., López-Ferber, M., Graillot, B., Nicot, P. C. & Siegwart, M. Durability of efficacy of biological control against plant pathogens: a review. *Frontiers in Plant Sciences*. **(Soumis)**

Sieewart, M., Grailot, B., López-Blachere, C., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P. C. & López-Ferber, M. Durability of efficacy of biological control against pests: a review. *Frontiers in Plant Sciences*. (Soumis)

Présentations :

Communications :

Grailot, B., Blachère-Lopez, C., Besse, S., Sieewart, M. & López-Ferber, M. (2013). Variation in the susceptibility to CpGV in population of the codling moth, *Cydia pomonella*. *14th European meeting of the IOBC-WRPS. Working group Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. Zagreb, Croatie. 16-20 juin 2013.

Grailot, B., Bayle, S., Besse, S., Blachère Lopez, C., Sieewart, M. & López-Ferber, M. (2014). CpGV-R5 allows replication of CpGV-M in resistant host insect larvae. *47th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*. Mainz, Allemagne. 4-7 août 2014.

López-Ferber, M., Grailot, B., Blachere-Lopez, C., Sieewart, M., Besse, S., Bardin, M. & Nicot, P. C. (2015). Is the efficiency of biological control against insect pests likely to be more durable than that of chemical pesticides? Lessons learned using CpGV to protect apple orchards from codling moth. *IPM innovation in Europe*, Poznan. Pologne. 14-16 Janvier 2015.

Bardin, M., Grailot, B., Besse, S., Blachère Lopez, C., Nicot, P. C., Sieewart, M. & López-Ferber, M. (2015). Is the efficiency of biological control against insect pests likely to be more durable than that of chemical pesticides? *IPM innovation in Europe*, Poznan. Pologne. 14-16 Janvier 2015.

Grailot, B., Besse S., Sieewart, M. & López-Ferber, M. Présentation de résultats lors du workshop du groupe «Risk analysis of resistance development towards natural antagonists of crop pests and diseases », lors des sessions du 7-9 Mars 2012 à Corte Benedettina, Italie et du 4-7 mars à Valence, Espagne. Ces présentations ont été réalisées dans le cadre du projet Européen PURE, IPM innovation in Europe.

Posters :

Grailot, B., Besse, S., Blachère-Lopez, C., Sieewart, M. & López-Ferber, M. (2013). Sequence analysis of CpGV-R5 isolate able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome. *14th European meeting of the IOBC-WRPS. Working group Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. Zagreb, Croatia. 16-20 juin 2013.

Grailot, B. (2014). Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de baculovirus dans les conditions de protection des cultures. *Journée de la recherche, Ecole nationale supérieure des mines de Saint Etienne*, Saint-Etienne, France. 12 juin 2014.

Grailot, B., Blachère-Lopez, C., & López-Ferber, M. (2014) La lutte biologique comme moyen de diminuer la pollution diffuse cause par les pesticides chimiques. *Colloque Institut Mines-Télécom "Ressources naturelles et environnement"*. Paris, France. 5-6 novembre 2014.

Table des matières

Chapitre 1. Introduction générale	1
1. La protection des cultures	1
1.1. Combien représentent ces pertes ?.....	2
1.2. Quels sont les agents contre lesquels il faut se protéger ?.....	7
1.2.1. Les pathogènes	7
1.2.2. Les ravageurs	8
1.3. Quelles sont les méthodes de protection ?.....	8
1.3.1. Les barrières physiques	9
1.3.2. Les barrières culturales	10
1.3.3. Les agents phytosanitaires.....	10
1.3.3.1. Les agents chimiques	11
1.3.3.2. Les produits de biocontrôle.....	12
1.3.3.2.1. Les macro-organismes.....	13
1.3.3.2.1.1. Les parasitoïdes	13
1.3.3.2.1.2. Les nématodes	14
1.3.3.2.2. Les produits phytopharmaceutiques.....	14
1.3.3.2.2.1. Substances naturelles	14
1.3.3.2.2.2. Agents biologiques vivants.....	17
1.3.3.2.2.2.1. Micro-organismes	17
1.3.3.2.2.2.1.1. Champignons	17
1.3.3.2.2.2.1.2. Bactéries.....	17
1.3.3.2.2.2.1.3. Virus	19
1.3.3.2.2.2.2. Médiateurs chimiques.....	20
1.4. Diminution de l'efficacité des méthodes de protections	20
1.4.1. Changement de comportement de l'agent.....	20
1.4.2. Résistance de l'hôte	21
1.4.2.1. Résistances aspécifiques	22
1.4.2.2. Résistances spécifiques	23
2. Développement industriel de Bio-insecticides	26
3. Le modèle d'étude : Le carpocapse des pommes et le virus de la granulose	32
3.1. Le carpocapse des pommes	32
3.2. Les baculovirus.....	36

3.2.1. Structure	36
3.2.2. Le cycle d'infection.....	42
3.2.2.1. L'infection primaire.....	43
3.2.2.2. L'infection systémique (ou secondaire)	43
3.2.2.3. Le cycle de réplication dans la cellule.....	44
3.2.3. Les gènes viraux	46
3.2.4. Coévolution et stratégie adaptative des baculovirus	48
3.2.5. Le virus de la granulose de <i>Cydia pomonella</i>	49
3.2.6. Relation baculovirus/hôte : développement de résistances	52
4. Objectifs de la thèse	55
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	56
1. Les colonies d'insectes.....	56
1.1. Les colonies de carpocapse sensibles au virus (Sv et CpNPP).....	56
1.2. La colonie de carpocapse de laboratoire, résistante à CpGV-M (R _{GV})	56
1.3. La population mixte de carpocapse (CpLGEI)	57
1.4. La tordeuse orientale du pêcher (<i>Cydia molesta</i>) (TO).....	57
2. Les isolats viraux.....	57
3. Elevages de <i>Cydia pomonella</i> et <i>Cydia molesta</i>	58
3.1. Elevages de masse	58
3.2. Elevages sans sélection au virus	59
3.3. Sélection de la population R _{GV} de <i>C. pomonella</i> par survie au traitement au CpGV-M.....	59
4. Essais biologiques.....	59
4.1. Tests biologiques	59
4.2. Analyse des données	60
5. Amplification et purification du virus	60
5.1. Amplification sur larves	60
5.2. Passages successifs sur larves	61
5.3. Populations expérimentales issues de mélanges de CpGV-M + CpGV-R5	62
5.4. Passages successifs de CpGV-R5 sur larves sensibles CpNPP	62
5.5. Passages successifs d'une population génotypiquement hétérogène sur <i>C. molesta</i>	63
6. Extraction/purification ADN	63
7. Analyse de la diversité génétique par RFLP « Restriction Enzyme Length Polymorphism » ..	64
8. Séquençage et analyse basique du génome de 5 isolats viraux	64
8.1. Séquençage et étude des séquences	64

8.2. Extraction d'ADN par lyse des granules	64
8.3. Amplification de fragments viraux par « Polymerase Chain Reaction »	65
8.4. Comparaison des séquences	65
8.5. Dot plots	65
8.6. Analyse des ORF positivement sélectionnées	65
9. Analyse de la diversité génétique de marqueurs viraux par PCR	66
9.1. Détermination de marqueurs spécifiques pour les isolats viraux CpGV-M et CpGV-R5 pour PCR quantitative	66
9.2. Extraction ADN pour PCR quantitative.....	66
9.3. PCR quantitative.....	66
9.4. PCR dans la zone du gène <i>pe38</i>	67
10. Persistance du virus dans les populations d'insectes en champs	68
10.1. Extraction d'hémolymphe	68
10.2. Récupération des corps gras	70
10.3. Analyse par PCR quantitative.....	70

Partie 1 : Variabilité entre différentes populations d'hôtes

Chapitre 3. Variation de sensibilité de trois colonies de laboratoire de carpocapse des pommes, <i>Cydia pomonella</i> au CpGV	71
1. Introduction	71
2. Résultats	73
2.1. Analyse de la différence de sensibilité de trois colonies à deux isolats viraux	73
3. Discussion.....	74
4. Conclusion de la partie	76

Partie 2 : Adaptation du virus à des hôtes non-permissifs

Chapitre 4. Adaptation progressive d'un isolat de CpGV aux populations de carpocapses résistantes à CpGV-M.....	77
1. Introduction	77
2. Résultats	80
2.1. Analyse des profils de restriction de l'isolat NPP-R1 après passage sur insectes résistants	80
2.2. Production virale des différents isolats	80
2.3. Tests biologiques	82
2.4. Analyse du coût pour l'isolat CpGV-R5 à contourner la résistance des insectes	84
3. Discussion.....	86

4. Conclusion	88
----------------------------	----

Chapitre 5. Comparaison de séquences de cinq isolats de *Cydia pomonella* granulovirus :
détection des gènes positivement sélectionnés..... 89

1. Introduction	89
------------------------------	----

2. Résultats	91
---------------------------	----

2.1. Séquençage complet du génome de 5 isolats viraux et comparaison avec le génome de référence CpGV-M1.....	91
--	----

2.1.1.Séquençage complet du génome de <i>CpGV-M</i>	93
---	----

2.1.2.Séquençage complet du génome de <i>CpGV-E2</i>	99
--	----

2.1.3.Séquençage complet du génome de <i>CpGV-II2</i>	105
---	-----

2.1.4.Séquençage complet du génome de <i>CpGV-R1.8</i>	113
--	-----

2.1.5.Séquençage complet du génome de <i>CpGV-R5</i>	121
--	-----

2.2. Analyse des gènes à sélection positive.....	129
--	-----

3. Discussion	130
----------------------------	-----

4. Conclusion	131
----------------------------	-----

Chapitre 6. Adaptation du CpGV à la tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) par
évolution dirigée..... 133

1. Introduction	133
------------------------------	-----

2. Résultats	139
---------------------------	-----

2.1. Tests d'efficacité des isolats viraux résultant des passages successifs sur TO.....	139
--	-----

2.2. Tests d'efficacité des productions virales issues des passages successifs issus de TO sur une colonie sensible de carpocapse du pommier	141
---	-----

2.3. Production de Vofm-12 sur population de carpocapse sensible, et tests d'efficacité	143
---	-----

2.4. Profils enzymatiques et analyse du gène <i>pe38</i>	143
--	-----

3. Discussion	144
----------------------------	-----

4. Conclusion	146
----------------------------	-----

Conclusion de la partie	147
--------------------------------------	-----

Partie 3 : Diversité génétique et étude du maintien des populations virales

Chapitre 7. Caractéristiques biologiques de différents mélanges expérimentaux de CpGV :
capacité à contrôler les populations sensibles et résistantes..... 149

1. Introduction	149
------------------------------	-----

2. Résultats	152
---------------------------	-----

2.1. Réplication des géotypes viraux dans les différents hôtes	152
2.2. Efficacité des virus purs	154
2.3. Efficacité des populations mélangées de virus	159
3. Discussion	160
4. Conclusion de la partie	163

Partie 4 : Evolution expérimentale de 5 populations virales mixtes

Chapitre 8. Evolution des mélanges viraux : tests d'efficacité et analyse des proportions de chaque génome après plusieurs passages sur larves de carpocapses sensibles et résistantes.. 164

1. Introduction	164
2. Résultats	167
2.1. Tests d'efficacité.....	167
2.1.1. <i>Efficacité des productions issues de larves sensibles CpNPP</i>	167
2.1.2. <i>Efficacité des productions issues de larves résistantes R_{GV}</i>	172
2.2. Analyse de la proportion de marqueurs de chaque génome par PCRq	176
2.3. Quantification de marqueurs pe38 sur les différentes productions de mélanges : comparaison avec les résultats précédemment obtenus	179
3. Discussion	183
4. Conclusion de la partie	185

Conclusion générale	186
----------------------------------	-----

Références bibliographiques

Annexes

Table des Figures et Tableaux

Figures

Chapitre 1 :

Figure 1.1. Production mondiale de pommes par an (en millions de tonnes).....	6
Figure 1.2. Top 10 des pays producteurs de pomme dans le monde pour l'année 2012.....	6
Figure 1.3. Filets de protection des vergers contre le carpocapse des pommes (Alt'Carpo®).....	9
Figure 1.4. Représentations du carpocapse des pommes (<i>Cydia pomonella</i>).....	33
Figure 1.5. Répartition géographique du carpocapse des pommes (<i>Cydia pomonella</i> L.) en 2010.....	34
Figure 1.6. Cycle annuel de <i>Cydia pomonella</i>	35
Figure 1.7. Représentation de la forme incluse du baculovirus (ODV)	38
Figure 1.8. Représentation la forme bourgeonnante d'un baculovirus	38
Figure 1.9. Représentation des différents types de baculovirus : MNPV, SNPV et GV	40
Figure 1.10. Distribution des protéines d'enveloppe de fusion	41
Figure 1.11. Cycle de répllication du baculovirus	42
Figure 1.12. Représentation de certaines protéines structurales des ODV	44
Figure 1.13. <i>Cydia pomonella</i> granulovirus observé au microscope électronique et larve de <i>Cydia pomonella</i> infectée par le virus de la granulose, CpGV.....	50
Figure 1.14. Transferts des isolats de CpGV entre les différents instituts de recherche et firmes phytosanitaires.....	51

Chapitre 2 :

Figure 2.1. Préparation d'un test biologique sur larves néonates	60
Figure 2.2. Larves diapausantes utilisées dans nos expériences.....	68

Chapitre 3 :

Figure 3.1. Dose/mortalité de l'isolat CpGV-M sur trois colonies d'insectes	74
Figure 3.2. Dose/mortalité de l'isolat CpGV-R5 sur trois colonies d'insectes	74

Chapitre 4 :

Figure 4.1. Efficacité de CpGV-M, NPP-R1 et CpGV-R5 sur colonie sensible Sv et résistantes R _{GV}	78
Figure 4.2. Plan d'expérience du chapitre 4	79
Figure 4.3. Représentation schématique des génomes des isolats des CpGV obtenus après amplifications séquentielles sur larves résistantes R _{GV}	81

Figure 4.4. Evolution de l'efficacité de CpGV-R5 sur larves résistantes R_{GV} après passages sur larves sensibles 85

Figure 4.5. Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % de l'ADN de CpGV-M, CpGV-R5, R5S10 et R5S20 digéré par les enzymes de restriction *PstI*, *Sall*, *EcoRI* et *BamHI*..... 86

Chapitre 5 :

Figure 5.1. Carte de l'alignement complet des 5 génomes viraux avec le génome de référence..... 92

Figure 5.2. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-E2 105

Figure 5.3. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-I12 112

Figure 5.4. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-R1.8 121

Figure 5.5. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-R5 129

Chapitre 6 :

Figure 6.1. Illustration de la tordeuse du pêcher *Cydia molesta*..... 133

Figure 6.2. Répartition géographique de la tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) en 2010... 136

Figure 6.3. Plan d'expérience du chapitre 6 138

Figure 6.4. Efficacité sur TO des productions virales issues des passages successifs du mélange viral produit sur TO 140

Figure 6.5. Efficacité sur Carpopapse des productions virales issues des passages successifs du mélange viral produit sur TO 142

Figure 6.6. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 grâce au marqueur CpGV-18800 localisé dans le gène *pe38* pour les isolats CpGV-M, CpGV-R5, Vofm-12 et 5 productions indépendantes de l'isolat Vofm-12-cp 144

Chapitre 7 :

Figure 7.1. Efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des 5 mélanges viraux sur la colonie sensible CpNPP..... 155

Figure 7.2. Efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des 5 mélanges viraux sur la colonie résistante R_{GV} 156

Figure 7.3. Efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des 5 mélanges viraux sur la colonie mélangée CpLGEI..... 156

Figure 7.4. Efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des 5 mélanges viraux sur la colonie sensible Sv 157

Figure 7.5. Représentation dose/mortalité sur les colonies CpLGEI pour CpGV-M et le mélange M90-R10..... 158

Chapitre 8 :

Figure 8.1. Plan d'expérience du chapitre 8	166
Figure 8.2. Efficacité (CL ₅₀ et CL ₉₀) sur CpNPP des différents mélanges viraux produits sur larves sensibles	169
Figure 8.3. Efficacité (CL ₅₀ et CL ₉₀) sur R _{GV} des différents mélanges viraux produits sur larves sensibles	171
Figure 8.4. Efficacité (CL ₅₀ et CL ₉₀) sur CpNPP des différents mélanges viraux produits sur larves résistantes	173
Figure 8.5. Efficacité (CL ₅₀ et CL ₉₀) sur R _{GV} des différents mélanges viraux produits sur larves résistantes	175
Figure 8.6. Différenciation de CpGV-M et CpGV-R5 ainsi que des 5 mélanges viraux d'origine grâce aux primers <i>pe38</i>	180
Figure 8.7. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 grâce au marqueur « CpGV-18800 » localisé dans le gène <i>pe38</i> pour les différentes productions des mélanges viraux issues de larves sensibles CpNPP	181
Figure 8.8. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 R5 grâce au marqueur « CpGV-18800 » localisé dans le gène <i>pe38</i> pour les différentes productions des mélanges viraux issues de larves résistantes R _{GV}	182

Tableaux

Chapitre 1 :

Tableau 1.1. Pertes potentielles estimées à la récolte dues aux mauvaises herbes, ravageurs, pathogènes et virus et pertes réelles pour les années 2001-2003 pour 6 cultures majeures à travers le monde (19 régions)	3
Tableau 1.2. Estimations des pertes à la récolte réelles provoquées par les mauvaises herbes, les ravageurs et les maladies dans les productions mondiales de blé, de maïs et de coton	4
Tableau 1.3. Pertes annuelles en % de production dues à différents agents sur 4 continents et dans le monde en 1999	4
Tableau 1.4. Productions agricoles mondiales en millions de tonnes et en valeur estimée pour les principales cultures	5
Tableau 1.5. Bio-insecticides commercialisés formulés à base de baculovirus	28-31
Tableau 1.6. Comparaison de données sur les performances des agents de contrôle chimiques et biologiques	32

Chapitre 2 :

Tableau 2.1. Composition des différents mélanges viraux réalisés 62

Tableau 2.2. Séquence des oligonucléotides utilisés, taille du fragment amplifié chez les virus CpGV-M et CpGV-R5 et technique d'amplification utilisée 69

Chapitre 3 :

Tableau 3.1. Efficacité biologique de deux isolats de CpGV sur trois colonies de laboratoire 73

Chapitre 4 :

Tableau 4.1. Production par larve et par gramme de larve de trois isolats viraux sur colonie sensible au virus, CpNPP 80

Tableau 4.2. Pathogénicité mesurée par CL_{50} et CL_{90} , de cinq isolats viraux sur une colonie de laboratoire de *C. pomonella* sensible, une colonie résistante à CpGV-M et une colonie hétérogène ... 83

Tableau 4.3. Pathogénicité mesurée par CL_{50} et CL_{90} , de l'isolat CpGV-R5 et des passages 5, 10, 15 et 20 sur une colonie de laboratoire de *C. pomonella* sensible, CpNPP et une colonie résistante à CpGV-M, RGV 84

Chapitre 5 :

Tableau 5.1. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-M 95-99

Tableau 5.2. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-E2..... 100-105

Tableau 5.3. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-I12..... 106-112

Tableau 5.4. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-R1.8..... 114-120

Tableau 5.5. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-R5 122-129

Chapitre 6 :

Tableau 6.1. Efficacité sur TO des productions virales issues des passages successifs du mélange d'isolats sur TO 139

Tableau 6.2. Efficacité sur CpNPP des productions issues des passages successifs du mélange d'isolats sur TO 141

Chapitre 7 :

Tableau 7.1. Proportion relative du marqueur spécifique « CpGV-15600 » comparé au marqueur commun « CpGV-138300 » dans les différents mélanges et dans les OB collectés après une amplification (P1) de ces mélanges sur larves sensibles (CpNPP) et résistantes (R_{GV})..... 153

Tableau 7.2. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , de deux isolats viraux (CpGV-M and CpGV-R5) et de 5 mélanges de ces deux isolats en différentes proportions sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensibles (CpNPP) et résistantes au virus (R_{GV}). 154-155

Chapitre 8 :

Tableau 8.1. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , des 6 productions successives sur larves sensibles CpNPP de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensibles au virus (CpNPP) 168

Tableau 8.2. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , des 6 productions successives sur larves sensibles (CpNPP) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* résistantes au virus (R_{GV})..... 170

Tableau 8.3. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , des 6 productions successives sur larves résistantes (R_{GV}) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensibles (CpNPP)..... 172

Tableau 8.4. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , des 6 productions successives sur larves résistantes (R_{GV}) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* résistantes au virus (R_{GV})..... 174

Tableau 8.5. Pourcentage d'allèles provenant de CpGV-M sur le marqueur « CpGV-15600 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » et de CpGV-R5 par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves sensibles CpNPP 176

Tableau 8.6. Pourcentage d'allèles provenant de CpGV-M sur le marqueur « CpGV-15600 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » et de CpGV-R5 par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves résistantes R_{GV} 177

Tableau 8.7. Pourcentage d'allèles provenant de CpGV-R5 sur le marqueur « CpGV-20400 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » et de CpGV-M par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves sensibles CpNPP 177

Tableau 8.8. Pourcentage d'allèles provenant de CpGV-R5 sur le marqueur « CpGV-20400 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » et de CpGV-M par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves résistantes R_{GV} 178

Tableau 8.9. Distances en nucléotides entre les marqueurs utilisés 179

Glossaire

BET : Bromure d'éthidium

Bt : *Bacillus thuringiensis*

BV : Budded virus

CIP : Centre international de la Pomme de Terre

CL : Concentration létale

Cp : *Cydia pomonella*

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DL : Dose létale

Gis Sol : Groupement d'intérêt scientifique sur les sols

GV : Granulovirus

HCH : Hexachlorocyclohexane

hr : Highly repeated regions

IAP : Inhibitor of apoptosis

ie : Immediate early

MP : Membrane péritrophique

nAChR : Récepteurs de l'acétylcholine

(S ou M) NPV : Single ou Multiple Nucléopolyhédrovirus

OB : Occlusion body (Corps d'inclusion)

OFM ou TO : Oriental fruit moth ou tordeuse orientale (*Cydia molesta*)

ODV : Occlusion derived virion

ORF : Open reading frame

PBO : Piperonylbutoxide

PCR(q) : Polymerase Chain Reaction (quantitative)

PFT: Pore forming toxin

PIF : *per os* infectivity factor

PTTH : Hormone prothoracicotropique

RFLP : Restriction Enzyme Length Polymorphism

SNP : Single Nucleotide Polymorphisms

TAE : tris acétate EDTA

TBE : tris borate EDTA

Introduction générale

The study found the highest levels of pesticide residue in peaches, apples, pears...



Bennett THE CHRISTIAN SCIENCE MONITOR

...and spinach.



Chapitre 1. Introduction Générale

Des parties de ce chapitre bibliographique proviennent de deux revues élaborées dans le cadre du projet Européen PURE et soumises au journal « Frontiers in Plant Sciences »: « **Graillot, B., Siegwart, M., Blachère-Lopez, C., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P. C. & Lopez-Ferber, M. (2015)** Durability of efficacy of biological control against pests: a review » et « **Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Nicot, P. & Siegwart, M. (2015)**. Durability of efficacy of biological control against plant pathogens: a review.

1. La protection des cultures

La forte augmentation de la population mondiale ces 50 dernières années conduit à une demande agricole toujours plus importante. L'impact des pertes à la récolte pose à la fois un problème économique et de santé publique, la production devant nourrir l'ensemble des populations. Le développement de méthodes permettant de protéger les cultures est donc plus que jamais une priorité.

Les premiers insecticides et fongicides (composés soufrés et d'origine naturelle) ont été décrits par les Sumériens et les Chinois en 2500-1500 avant J.C. Au 17^{ème} siècle, des extraits aqueux de tabac étaient déjà utilisés pour contrôler les ravageurs de cultures. A cette époque, la plupart des pesticides étaient des extraits de plantes. A partir du 20^{ème} siècle, la mise au point de pesticides de synthèse a fourni de nouveaux outils pour limiter les pertes à la récolte et après récolte (au stockage). Cependant, leur utilisation intensive a entraîné des pollutions importantes des milieux naturels et une apparition rapide de phénomènes de résistance.

L'utilisation de prédateurs naturels des ravageurs, de toxines naturelles d'origine bactérienne ou encore de virus d'insectes n'est pas nouvelle. Relativement oubliées, surtout dans les pays développés et pendant la période d'expansion du tout chimique, ces approches suscitent un regain d'intérêt à mesure que notre arsenal de produits efficaces diminue.

Non polluantes pour la plupart, ces méthodes ne sont pas exemptes de défauts, et leur utilisation intensive a conduit elle aussi à l'apparition de résistances, qui en a rendu certaines inefficaces. Il ne semble donc pas y avoir de remède miracle et de tels phénomènes de résistance conduisent à se poser des questions sur la durabilité de telles méthodes pour le contrôle des ravageurs des cultures. L'analyse de cette durabilité est donc indispensable pour permettre le maintien d'une lutte efficace contre les ravageurs et des pertes de récolte les moins importantes possibles.

1.1. Combien représentent ces pertes ?

Les pertes à la récolte varient en fonction des cultures mais aussi des saisons suivant les variations d'incidence des pathogènes, ravageurs et mauvaises herbes. Ainsi, les pertes globales potentielles pour les cultures de blé en 2003 étaient estimées à 50% tandis que celles des cultures de cotons s'élevaient à 80% (Oerke, 2006). L'utilisation des systèmes de lutte permet de réduire ces chiffres à environ 30% de pertes en moyenne. Le [tableau 1.1](#), adapté de Oerke (2006), présente les pertes potentielles et réelles sur la période 2001 - 2003. Les pertes pour ces années diffèrent de celles estimées dans de précédentes études ([Tableau 1.2](#) ; Cramer, 1967 ; Oerke *et al.*, 1994). Ces différences indiquent la difficulté de prévision des pertes et mettent en évidence le problème de la variabilité importante des méthodologies de mesures et des données obtenues. Le [tableau 1.3](#) représente les pertes annuelles par continent en 1999.

Il est intéressant d'observer que, même dans les pays développés, où des pesticides de synthèse ont été massivement utilisés, les pertes relatives n'ont pas diminué de manière significative. Par contre, les rendements par hectare ont augmenté.

Tableau 1.1. Pertes potentielles estimées à la récolte dues aux mauvaises herbes, ravageurs, pathogènes et virus et pertes réelles pour les années 2001-2003 pour 6 cultures majeures à travers le monde (19 régions). Ce tableau est adapté de Oerke (2006).

Type de culture	Production réalisable (Mt)	Pertes (%) dues à											
		Mauvaises herbes		Ravageurs		Pathogènes		Virus		Total			
		Potentielles	Réelles	Potentielles	Réelles	Potentielles	Réelles	Potentielles	Réelles	Potentielles	Réelles		
Blé	785,0	23,0 (18-29)	7,7 (3-13)	8,7 (7-10)	7,9 (5-10)	15,6 (12-20)	10,2 (5-14)	2,5 (2-3)	2,4 (2-4)	49,8 (44-54)	28,2 (14-40)		
Riz	933,1	37,1 (34-47)	10,2 (6-16)	24,7 (13-26)	15,1 (7-18)	13,5 (10-15)	10,8 (7-16)	1,7 (1-2)	1,4 (1-3)	77,0 (64-80)	37,4 (22-51)		
Mais	890,8	40,3 (37-44)	10,5 (5-19)	15,9 (12-19)	9,6 (6-19)	9,4 (8-13)	8,5 (4-14)	2,9 (2-6)	2,7 (2-6)	68,5 (58-75)	31,2 (18-58)		
Pomme de terre	517,7	30,2 (29-33)	8,3 (4-14)	15,3 (14-20)	10,9 (7-13)	21,2 (20-23)	14,5 (7-24)	8,1 (7-10)	6,6 (5-9)	74,9 (73-80)	40,3 (24-59)		
Soja	244,8	37,0 (35-40)	7,5 (5-16)	10,7 (4-16)	8,8 (3-16)	11,0 (7-16)	8,9 (3-16)	1,4 (0-2)	1,2 (0-2)	60,0 (49-69)	26,3 (11-49)		
Coton	78,52	35,9 (35-39)	8,6 (3-13)	36,8 (35-41)	12,3 (5-22)	8,5 (7-10)	7,2 (5-13)	0,8 (0-2)	0,7 (0-2)	82,0 (76-85)	28,8 (12-48)		

Tableau 1.2. Estimations des pertes à la récolte réelles provoquées par les mauvaises herbes, les ravageurs et les maladies dans les productions mondiales de blé, de maïs et de coton pour les années 1964/1965 (Cramer *et al.*, 1967), 1988/1990 (Oerke *et al.*, 1994) et 2001/2003 (Oerke, 2006). Ce tableau est adapté de Oerke (2006).

Période	Rendement (kg/ha)	Pertes réelles (%)			Total
		Mauvaises herbes	Ravageurs	Maladies	
Blé					
1964/1965	1250	9,8	5,0	9,1	23,9
1988/1990	2409	12,3	9,3	12,4	34,0
2001/2003	2691	7,7	7,9	12,6	28,2
Maïs					
1964/1965	2010	13,0	12,4	9,4	34,8
1988/1990	3467	13,1	14,5	10,8	38,3
2001/2003	4380	10,5	9,6	11,2	31,2
Coton					
1964/1965	1029	4,5	11,0	9,1	24,6
1988/1990	1583	11,8	15,4	10,5	37,7
2001/2003	1702	12,3	12,3	7,9	28,8

Tableau 1.3. Pertes annuelles en % de production dues à différents agents sur 4 continents et dans le monde en 1999 (<http://www7.inra.fr/dpenv/silvyd19.htm>).

Région	Ravageurs	Pathogènes	Mauvaises herbes
Monde	14	12	10
Europe	5	13	7
Amérique du Nord	9	11	8
Afrique	13	13	16
Asie	21	11	11

La **Tableau 1.4** présente les principales cultures mondiales en nombre de tonnes produites, ainsi qu'en valeur estimée. L'arboriculture fruitière représente une fraction importante de ces productions, bananes, pommes et oranges arrivant en tête. En 2012, les 10 principaux pays

producteurs de pommes fournissaient 75% de la production mondiale, soit 57 182 000 tonnes (Figure 1.1 et 1.2).

Tableau 1.4. Productions agricoles mondiales en millions de tonnes et en valeur estimée pour les principales cultures (sources FAOSTAT).

Matière première	Production nette 2004-2006 (Md int \$)	Production 2012 (MT)
Canne à sucre	57,86	1 842,26
Mais	53,60	872,79
Riz	185,58	738,19
Blé	79,29	671,50
Pommes de terre	48,77	365,37
Légumes frais	46,14	269,85
Betterave à sucre	10,81	269,83
Manioc (cassava)	25,69	269,13
Soja	60,69	241,14
Tomates	59,11	161,79
Orge (Barley)	4,66	133,51
Patate douce	4,74	108,00
Pastèques	11,09	105,37
Bananes	28,21	101,99
Oignons secs	17,37	82,85
Pommes	31,88	76,38

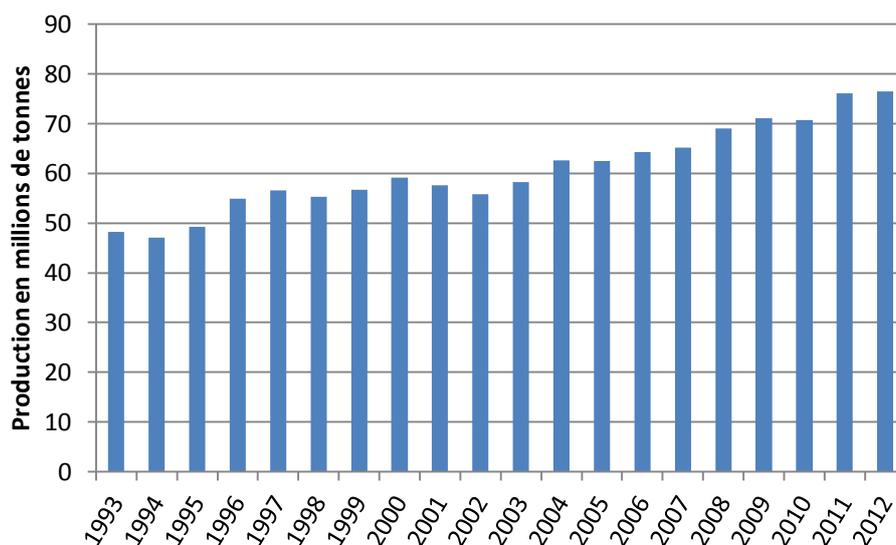


Figure 1.1. Production mondiale de pommes par an (en millions de tonnes) (source: FAOSTAT).

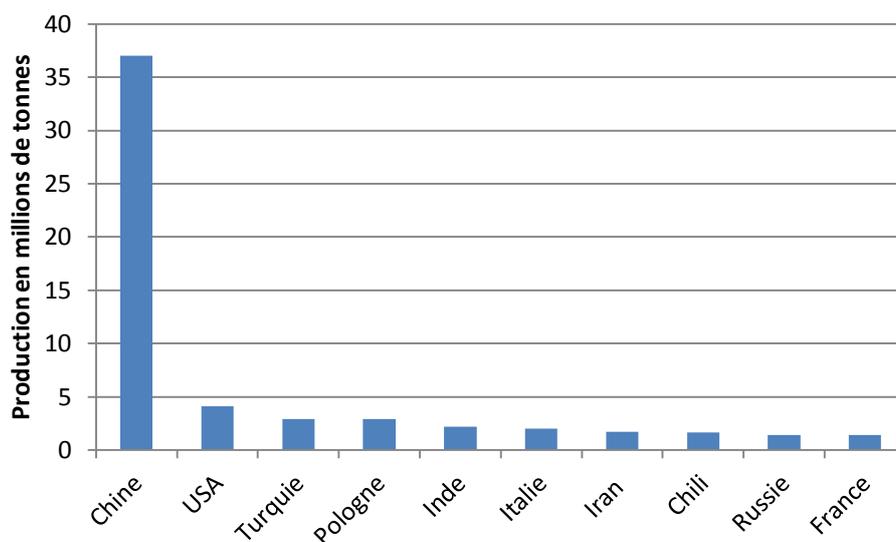


Figure 1.2. Top 10 des pays producteurs de pommes dans le monde pour l'année 2012 (source: FAOSTAT).

Pour contrer les ravageurs et limiter les pertes, l'utilisation de méthodes de contrôle, et plus particulièrement de pesticides, a augmenté fortement depuis les années 60. Le détail de ces méthodes de lutte est exposé dans le paragraphe 3.

1.2. Quels sont les agents contre lesquels une protection doit être mise en œuvre ?

Il existe de nombreux organismes s'attaquant aux cultures. Il peut s'agir de pathogènes de plantes, de plantes compétitives comme les mauvaises herbes et/ou de ravageurs. Les mauvaises herbes présentent le plus fort potentiel destructeur de cultures (34% de pertes) suivies des ravageurs (18% de pertes) et des pathogènes (16% de pertes) (Oerke, 2006). Une brève description des pathogènes et ravageurs des cultures est ici présentée.

1.2.1. Les pathogènes

Les pathogènes sont des microorganismes induisant des maladies sur les cultures comme une réduction de la photosynthèse ou une accélération de la sénescence des feuilles réduisant ainsi la productivité (Boote *et al.*, 1983). Ce sont des bactéries, des champignons et des virus phytopathogènes. Environ une centaine de bactéries, le plus souvent des bacilles, sont connues pour causer des maladies aux cultures (Jackson, 2009). On peut classer les facteurs de pathogénicité en cinq familles : enzymes dégradant les parois (comme celles synthétisées par les bactéries du genre *Erwinia*), toxines, protéines effectrices, phytohormones (comme celles sécrétées par le genre *Agrobacterium*) et exopolysaccharides. La majorité des champignons phytopathogènes sont des Ascomycètes comme les *Fusarium*, provoquant un flétrissement de la plante et des Basidiomycètes comme les *Puccinia* provoquant des tâches rougeâtres ou brunâtres et répandus chez toutes les céréales et plantes cultivées. Les virus de plantes sont très nombreux et, en temps normal, ne réduisent que faiblement le rendement des cultures. L'un des plus connus fait partie du genre *Tobamovirus*, provoquant la maladie de la mosaïque du tabac et induisant de fortes pertes économiques sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) (Gooding, 1969). Ces virus peuvent être transmis par des insectes vecteurs (comme les pucerons) et plus rarement par des champignons ou nématodes. Dans la plupart des cas, l'insecte vecteur est spécifique du virus transmis comme c'est le cas pour *Circulifer tenellus* transmettant le virus de l'enroulement apical (Creamer *et al.*, 2005).

1.2.2. Les ravageurs

Il existe un nombre extrêmement important de parasites des cultures. Certains de ces ravageurs ont accompagné la dispersion des cultures auxquelles ils s'attaquent. D'autres ont été introduits par l'homme plus récemment lors de voyages ou d'échanges commerciaux. Finalement, certains sont devenus des ravageurs par adaptation à une nouvelle source d'alimentation disponible (dans les cas des changements d'utilisation des sols agricoles, par exemple).

Parmi les ravageurs de cultures, on compte des oiseaux, des rongeurs, des limaces et escargots, des nématodes ou encore des insectes. La classe des Insectes regroupe le plus grand nombre d'espèces de ravageurs des cultures, ainsi que ceux produisant les dommages les plus importants. Le reste de ce travail se centrera sur eux.

Un exemple récent d'introduction d'insectes par l'homme est celui de la teigne du Guatemala, *Tecia solanivora*. L'infestation des cultures de pomme de terre par ce ravageur, pour la première fois décrit au Costa Rica (Povolny, 1973) était due à une introduction accidentelle causée par un changement de semences de pommes de terre provenant du Guatemala. Ce ravageur a ensuite colonisé les cultures de plusieurs pays d'Amérique du sud (Niño, 2004). Seule une partie des dégâts de ce ravageur est causée en champs, l'autre partie se produisant en conditions de stockage.

1.3. Quelles sont les méthodes de protection ?

De nombreuses méthodes de protection des cultures contre les ravageurs et pathogènes ont été mises au point. Ces méthodes sont, pour certaines, très anciennes. Dès le 17^{ème} siècle, des décoctions de tabac, contenant de la nicotine, était déjà appliquées sur certaines cultures. Au début du 19^{ème} siècle, la lutte contre les ravageurs était devenue une priorité et des recueils sur la protection des cultures, notamment des vergers étaient déjà publiés comme par exemple un ouvrage de 1804 intitulé « Du Pommier, Du Poirier et Du Cormier » (Dubois, 1804). Ces pratiques sont ici développées en trois parties : les barrières physiques, les barrières culturales et l'utilisation d'agents phytosanitaires.

1.3.1. Les barrières physiques

Cette méthode de contrôle, aussi appelée lutte mécanique, consiste à bloquer l'accès du ravageur aux vergers ou aux plantations.

Une technique de ce type est utilisée contre l'un des principaux ravageurs de la vigne : *Phylloxera vastatrix*. Celle-ci consiste à inonder les vignes en hiver pendant une longue période (environ 50 jours) dans une trentaine de centimètres d'eau, permettant de tuer les œufs de l'insecte et donc de diminuer les populations hivernantes puis l'infestation et les dégâts sur la récolte suivante.

Dans les pommeraies, l'application d'argile calcinée sur les arbres est employée pour lutter contre le puceron cendré.

Une autre méthode consistera à poser des filets empêchant ainsi la ponte des ravageurs sur les cultures et l'infestation par les larves phytophages. Il peut s'agir de l'installation de filets au niveau des ouvrants dans les cultures sous abris, de filets ou de bâches à plat sur la culture ou autour, en tunnel, ou encore de filets verticaux pour empêcher la pénétration des ravageurs se déplaçant au ras des cultures. Un exemple réussi de cette méthode est le projet Alt'Carpo[®]. Elaborée en 2005 et mis en place en verger en 2007, consistant en la pose de filets sur les vergers pour empêcher l'infestation par le carpocapse des pommes (Figure 1.3).

Ces mesures sont souvent combinées avec un traitement à base de pesticides, chimiques ou biologiques, pour garantir une meilleure efficacité.



Figure 1.3. Filets de protection des vergers contre le carpocapse du pommier (Alt'Carpo[®]). Photos : www.alt-carpo.com.

1.3.2. Les barrières culturales

La modification des pratiques culturales peut permettre, à elle seule, de réduire les dégâts à la récolte.

Une méthode simple est de choisir une nouvelle variété précoce pour remplacer la variété attaquée par le ravageur. Celle-ci donnera une récolte anticipée qui pourra se faire avant l'explosion de la population de ravageur. Cette technique est notamment utilisée pour les cultures de cerises.

Des modifications de méthodes de cultures ont aussi été réalisées sur la pomme de terre pour lutter contre l'un de ses principaux ravageurs, la teigne du Guatemala, *Tecia solanivora*. Il a été montré qu'il était possible de réduire les dommages causés par ce ravageur en effectuant des plantations profondes des semences afin d'obtenir une distance importante entre la surface du sol et les tubercules et ainsi éviter que le ravageur n'arrive jusqu'aux tubercules via les crevasses de la terre (Corredor & Flórez, 2003).

Une autre possibilité est l'alternance des cultures consistant à planter chaque année des plantes de familles éloignées avec des temps de croissance différents pour éviter la production continue de générations de ravageurs. En Colombie par exemple, les cultures de pommes de terre sont effectuées en alternance avec d'autres cultures telles que le maïs ou les légumes.

1.3.3. Les agents phytosanitaires

Les agents phytosanitaires sont regroupés au sein d'une large gamme de substances chimiques, les biocides. Ils regroupent les produits phytosanitaires, les antibiotiques, les désinfectants... Ces composés peuvent être regroupés en deux catégories : les agents chimiques et les agents biologiques. Dans cette partie, nous ne traiterons que des pesticides (herbicides, fongicides et insecticides) et des antibiotiques.

1.3.3.1. Les agents chimiques

Les agents phytosanitaires chimiques, utilisés en protection des plantes, sont classés en trois groupes : les herbicides, les fongicides ou les insecticides, utilisés dans la protection des plantes.

Leur toxicité peut être importante et n'est, en général, pas spécifique. Ces agents peuvent donc être toxiques pour tout être vivant, incluant l'homme.

L'arséniate de plomb par exemple a été utilisé comme pesticide à partir des années 30 et pendant une vingtaine d'années malgré sa forte toxicité. Son utilisation a laissé des résidus durables dans les sols et il a été classé cancérigène. Il est maintenant interdit en agriculture dans la plupart des pays du monde. Selon les rapports du Gis sol (Groupement d'intérêt scientifique sur les sols), de fortes quantités de plomb (en particulier dans le Bordelais) et de cuivre ont été retrouvées dans les sols viticoles, résultant de l'utilisation intensive par le passé de l'arséniate de plomb contre les tordeuses de la vigne et de la bouillie bordelaise contre le mildiou.

Des sels contenant du chrome, notamment l'arséniate de cuivre chromé, ont aussi été utilisés à partir des années 30. Ce pesticide servait à traiter le bois contre les champignons. Très efficace dans le traitement du bois destiné à l'extérieur (aires de jeux pour enfants, bancs, tables de pique-nique...), il a cependant été interdit à partir des années 90 du fait de sa forte toxicité et de son risque cancérigène (Fields, 2001).

Le développement de la chimie organique a fourni des substances bloquant de façon plus spécifique certaines réactions des cellules et montrant une spécificité plus importante pour certains groupes phylogénétiques (plantes, insectes, ...). Plus précisément, la présence de chitine, d'un exosquelette, ou l'existence de métamorphoses, constituent des cibles potentielles de développement d'insecticides.

Le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT est un insecticide chimique synthétisé en 1874 et utilisé pour la première fois au début de la seconde guerre ; il est devenu l'un des pesticides les plus utilisés par la suite. Des doutes sur son effet sur l'environnement ont été émis à la fin des années 1960 par des observations sur la diminution des populations d'oiseaux. Il a ainsi été plus tard prouvé que ce pesticide provoquait des effets néfastes sur la reproduction des oiseaux (Fry, 1995) ainsi que sur leur nourriture (Nocera *et al.*, 2012) et montrait un effet similaire sur la

reproduction des organismes aquatiques (Smith, 1991 ; Cooper, 1991). Depuis les années 80, le DDT a été interdit dans de nombreux pays. Il est, par contre, toujours utilisé contre les moustiques pour le contrôle du paludisme, le DDT étant le seul insecticide efficace.

Le glyphosate dont la version commerciale la plus connue est le Roundup® est un herbicide commercialisé depuis 1975 qui a été utilisé de façon intensive. La substance active pénètre par les organes aériens de la plante, se répand dans son intégralité par la sève et provoque un arrêt de la synthèse des acides aminés aromatiques. Le glyphosate n'est que peu toxique pour les animaux à sang chaud (Williams *et al.*, 2000) mais son mélange avec les surfactants contenus dans le Roundup® rend ce produit toxique (Goldstein *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2008). De plus, la dégradation du Roundup® est très lente, conduisant à une pollution des nappes phréatiques.

Comme indiqué, la quasi-totalité des pesticides a des répercussions plus ou moins importantes sur les organismes auxiliaires et l'environnement. Pour diminuer les effets nocifs, de nouveaux pesticides ont été mis au point : les produits de biocontrôle.

1.3.3.2. Les produits de biocontrôle

Suite aux problèmes de résistance et aux risques sanitaires induits par les insecticides chimiques, de nouvelles méthodes de contrôle ont été mises au point : les biopesticides ou produits de biocontrôle. Selon la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt, adoptée le 11 septembre 2014 par le parlement, les produits de biocontrôle sont définis comme « l'ensemble des produits utilisant des mécanismes naturels et qui sont utilisés dans le cadre de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures ». Ils sont classés en deux groupes: celui des macro-organismes et celui des produits phytopharmaceutiques comprenant les substances naturelles, les micro-organismes, et les médiateurs chimiques.

Une différence majeure existe entre les substances extraites et les organismes vivants. Ces derniers possèdent la capacité d'évoluer et de s'adapter à leurs hôtes, contrairement aux extraits biologiques. Cette importance était déjà décrite par Burges en 1971 qui, citant Pimentel (1968), croyait déjà que l'évolution de la résistance avait tendance à stabiliser les populations d'hôtes et d'agent de contrôle par un processus de feedback génétique.

1.3.3.2.1. Les macro-organismes

Chaque insecte possède un complexe d'ennemis naturels composé de macro-organismes et micro-organismes. Parmi les macro-organismes, on peut trouver des prédateurs incluant parasitoïdes et parasites.

Dans ce travail, nous ne détaillerons que deux exemples, ceux utilisés en agriculture pour le contrôle des ravageurs

1.3.3.2.1.1. Les parasitoïdes

Les guêpes parasitoïdes sont des organismes se développant dans ou sur un autre insecte et qui le tuent pendant ou en fin de développement (Godfray, 1994). Leur utilisation en lutte biologique consiste le plus souvent en une méthode inondative. Les plus utilisés sont les espèces du genre *Trichogramma*. Ces parasites d'œufs sont très efficaces en lutte biologique (Wajnberg & Hassan, 1994) et le plus souvent utilisés contre les lépidoptères ravageurs des cultures. Actuellement dans le monde, de nombreuses espèces sont utilisées sur différentes cultures telles que les céréales, le coton ou encore les cultures maraichères, et représentent environ 30 millions d'hectares traités (Li-Ying, 1994 ; Van Lenteren & Bueno, 2003). En France, cette lutte est utilisée contre la pyrale du maïs *Ostinia nubilalis* avec la guêpe parasitoïde *Trichogramma brassicae* et représente plus de 80 000 hectares. Elle nécessite des lâchers de plus de 200 000 individus par hectare (Frandon & Kabiri, 1999).

Leur utilisation n'est pas cantonnée aux lépidoptères, la guêpe parasitoïde *Aphidius colemani* est, par exemple, utilisée en serre contre divers ordres de pucerons.

L'utilisation de parasitoïdes est assez complexe car il faut bien prévoir les lieux de lâchers et conserver les organismes dans de bonnes conditions pour permettre une lutte efficace, mais les avancées technologiques et la recherche ont permis de faciliter leur production avec, par exemple, la possibilité de les produire sur milieu artificiel (Thompson 1999).

1.3.3.2.1.2. *Les nématodes*

Les nématodes utilisés en lutte biologique sont les nématodes entomophages (se nourrissant d'insectes). Ils sont utilisés contre de nombreux ravageurs comme les chenilles, les mouches, les limaces ou encore certains charançons. La première utilisation de nématodes en protection des cultures a été réalisée aux États-Unis contre le scarabée japonais, *Popillia japonica*, ravageur de céréales et de légumineuses (Glaser *et al.*, 1935). Leur mode d'action est assez simple : la larve de nématode infeste l'hôte et libère des bactéries contenues dans des vésicules. Ces bactéries vont provoquer la mort de l'insecte en 24 à 48 heures et les larves se nourrissent alors de l'intérieur du cadavre de l'hôte avant de continuer leur cycle et de rentrer dans le sol à la recherche de nouveaux hôtes (Ciche *et al.*, 2006 ; Ehlers, 2007). Pour plus de détails, il est possible de consulter Gaugler *et al.* (2002) pour leur biologie et Grewal *et al.* (2005) pour leur utilisation en lutte biologique.

1.3.3.2.2. *Les produits phytopharmaceutiques*

1.3.3.2.2.1. *Substances naturelles*

Pour contrôler leurs ennemis naturels, certaines plantes ont développé la capacité de synthétiser des substances dérivées de leur métabolisme secondaire et ayant des propriétés insecticides. Ces molécules peuvent être répulsives, provoquer des dysfonctionnements métaboliques ou avoir un effet toxique entraînant la mort de l'insecte. C'est le cas, par exemple, de la caféine dans le café, du glucosinolate chez les *Brassicaceae*, du psoralène dans le cèleri ou encore de la nicotine dans le tabac.

Les insecticides dérivés de plantes ont été utilisés pendant des siècles. Ces insecticides naturels ont connu un développement important entre les deux guerres mondiales avant d'être progressivement remplacés par les insecticides synthétiques, plus performants et moins coûteux. Ces insecticides chimiques ont été souvent développés à partir de molécules actives d'origine naturelle.

Parmi la variété de molécules naturelles ayant des propriétés insecticides, seules les plus utilisées seront détaillées ici comme les alcaloïdes, dont la nicotine, et les pyrèthres.

La nicotine est extraite des feuilles et tiges du tabac, *Nicotiana tabacum*. Cette molécule est très stable et possède une efficacité importante sur les insectes mais aussi une toxicité envers les mammifères, ce qui oblige à limiter son utilisation. Celle-ci est tout de même autorisée dans certains pays sous forme de préparations complexes (avec du savon ou dans une solution de sulfate alcalin). La nicotine affecte l'insecte par inhalation, ingestion et contact. Sa cible est le récepteur de l'acétylcholine (nAChRs) du système nerveux central. La nicotine, mimétique de l'acétylcholine, se fixe sur le récepteur postsynaptique et produit une dépolarisation continue des cellules nerveuses conduisant à une excitation permanente. Celle-ci entraîne la paralysie musculaire de l'insecte et sa mort (Bai *et al.*, 1991). Des néonicotinoïdes synthétiques basés sur ce mode d'action, mais ayant une toxicité plus faible envers les mammifères ont été développés.

Un autre exemple est celui des pyréthrinés, des insecticides botaniques autorisés en agriculture biologique dans de nombreux pays, extraits des fleurs séchées du *Tanacetum cinerariifolium* aussi appelé chrysanthème. Ces fleurs contiennent plusieurs produits insecticides mais ceux présentant la plus forte toxicité relative sont des groupes d'esters incluant des pyréthrinés. Ces composés sont très instables et rapidement dégradés par la lumière, l'air et la chaleur. Pour renforcer l'action du pyrèthre, des synergistes peuvent être ajoutés à la formulation; le plus utilisé est le piperonylbutoxide (PBO), également présent chez les plantes. Les préparations de pyrèthre contenant du PBO sont autorisées mais controversées pour leur toxicité sur les insectes auxiliaires et certains mammifères comme les rongeurs, les chats... Les pyréthrinés attaquent le système nerveux des insectes entraînant la paralysie et la mort. À nouveau, des pyréthroïdes de synthèse ont été développés, avec une plus grande stabilité, et une toxicité plus faible pour les vertébrés.

L'huile de neem est un des insecticides les plus utilisés en Inde. Elle est extraite des graines du neem (*Azadirachta indica*), un arbre originaire d'Inde poussant sur sols pauvres et dégradés en climat semi-aride. L'huile extraite de ces graines a un pouvoir répulsif, antiappétant et insecticide. Plus d'une centaine de molécules possédant ces propriétés ont été identifiées dans l'huile brute et la plupart appartiennent à la famille des terpénoïdes. La substance active principale de cette huile est l'azadirachtine (Akhila & Rani, 2002). L'huile brute ainsi que l'azadirachtine purifiée sont utilisées comme agents de biocontrôle. L'huile de neem brute et les

graines de neem peuvent être trouvées aussi bien en production industrielle qu'en production artisanale ; leur composition chimique reste variable.

L'azadirachtine est soluble dans les solvants polaires ; c'est un complexe de molécules ayant une structure difficilement déterminable. (Broughton *et al.*, 1986, Bilton *et al.*, 1987, Taylor, 1987, Turner *et al.*, 1987). Cette molécule, instable à la lumière, a un pouvoir antiappétant et inhibiteur de croissance sur les insectes qui n'ont pas été repoussés. Le pouvoir insecticide de l'azadirachtine est efficace à une dose beaucoup plus faible que le pouvoir répulsif (Ruscoe, 1972, Morgan, 2009). Il a été montré que sur 600 insectes testés à l'azadirachtine, 500 y étaient sensibles (Morgan, 2009). Il semble qu'un effet synergique existe entre les différents composés de l'huile de neem brute. En champ, elle est utilisée comme engrais, insecticide, fongicide et répulsif. L'activité insecticide de cette huile est aussi utilisée en élevage pour la désinfection des enclos ou en application directe sur les animaux pour prévenir la nuisance de parasites comme les tiques ou les mouches. Le pouvoir antiappétant de l'azadirachtine est très efficace : il réduit, par exemple, de plus de 50% la prise alimentaire des larves de *Spodoptera litura* par inhibition des sensilles gustatives (Koul *et al.*, 2004, Simmonds *et al.*, 1990). Il a été montré chez les pucerons que le premier repas était identique sur une plante saine et une plante traitée à l'azadirachtine mais que le second était considérablement réduit et les suivants supprimés sur la plante traitée (Nisbet *et al.*, 1993).

L'altération de la croissance provoquée par l'huile de neem semble être également très complexe. Des études histologiques sur des hormones dans le cerveau d'insectes ont montré un dysfonctionnement dans la synthèse, le transport et la sécrétion de trois de ces hormones : l'hormone prothoracicotropique (PTTH), l'allatostatine et l'allatoïnhibine. Ces dérèglements provoquent des dysfonctionnements dans la croissance et la reproduction des insectes. Chez les femelles, une dégénérescence des ovaires est observée ainsi qu'une détérioration du jaune de l'oeuf (Koul, 1984, Dorn *et al.*, 1987, Schmutterer, 1985). Chez les mâles, la spermatogénèse est interrompue avant la métaphase.

Les deux effets primaires de l'azadirachtine semblent être le blocage des canaux sodiums (Quiao *et al.*, 2014) et une apoptose des cellules via les mitochondries (Huang *et al.*, 2013). Ces deux actions induisent une cascade d'effets comme le blocage de la mitose (Huang *et al.*, 2011) et la réduction de la synthèse protéique (Timmins & Reynolds, 1992, Koul *et al.*, 1996).

1.3.3.2.2.2. Agents biologiques vivants

1.3.3.2.2.2.1. Micro-organismes

1.3.3.2.2.2.1.1. Champignons

Les champignons entomopathogènes sont connus et étudiés pour leurs propriétés insecticides. De nos jours, il y a plus de 700 espèces listées (Hajek & Stleger, 1994). Certaines sont commercialisées comme : *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria brongniartii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Entomophaga maimaiga*, *Hirsutella thompsonii* et *Lagenidium giganteum*.

Ces champignons pénètrent dans leur hôte par des brèches dans la cuticule préexistantes ou créées par le champignon grâce à des enzymes comme la chitinase. Des études ont montré que ces chitinases étaient des déterminants de virulence essentiels pour la pathogénicité (Fang *et al.*, 2005). Une autre étude a prouvé que différentes souches de *M. anisopliae*, plus ou moins virulentes, montraient une variation dans l'expression de 4 gènes codant pour des chitinases et que cette expression était proportionnelle à la virulence de chaque souche (Prakash *et al.*, 2012). D'autres effets ont été reportés pour ces enzymes de dégradation de membranes d'insecte comme pour la CEDP-1 (cutine-degrading protease), une protéine de la famille des Pr1, causant la mélanisation de l'insecte, qui est une réaction immunitaire normale chez les insectes mais qui peut entraîner la mort dans certaines conditions extrêmes. (St Leger *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2012b).

La dernière étape de la virulence de ces pathogènes est la dégradation des protéines de l'hôte pour libérer des nutriments. Des enzymes originaires de deux familles ont été identifiés : Pr1 (protease subtilisin-like) et Pr2 (protease trypsin-like). Ces deux types d'enzymes ont montré une corrélation avec la virulence de différentes souches (Castellanos-Moguel *et al.*, 2007).

1.3.3.2.2.2.1.2. Bactéries

Les toxines et antibiotiques sécrétés par les bactéries sont très utilisés en contrôle biologique. Il existe plus de 100 espèces de bactéries ayant une activité entomopathogène (Starnes *et al.*, 1993). Les plus utilisées sont: *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. loutimorbus*, *B. sphaericus* et *Saccharopolyspora spinosa*.

Bacillus thuringiensis (Bt) est le bio-insecticide le plus décrit et utilisé dans le monde. C'est une bactérie anaérobie, GRAM positive, de la famille des bacilles. Elle est très répandue, notamment dans les sols, l'eau, l'air et les feuilles des plantes sous forme végétative, mais il y a assez peu de détails sur sa multiplication dans ces environnements (Raymond *et al.*, 2010). Lorsque l'environnement trophique est favorable, elle se multiplie par fission binaire et vit sous forme végétative. Sous des conditions trophiques défavorables, elle sporule. C'est sous cette forme qu'elle va produire des protéines toxiques pour les insectes. Parmi elles, les protéines CRY et CYT forment des cristaux parasporaux (Bravo *et al.*, 2011). Les propriétés entomotoxiques de cette bactérie ont suscité un fort intérêt pour l'agriculture et des premiers tests ont été effectués en 1933. En champ, Bt a été utilisé depuis les années 50, au départ contre les lépidoptères défoliants. En 1970, la découverte de nouveaux sérotypes actifs contre les diptères (1977) et coléoptères (1981) a permis d'étendre son action larvicide contre les moustiques, les scarabées et les mouches noires. Les productions à base de Bt commercialisées sont composées de mélange de spores et de protéines cristallines (Raymond *et al.*, 2010) et occupaient 2% du marché des insecticides en 2011 (Bravo *et al.*, 2011). De nombreux isolats de Bt ont été décrits. Ils sont classés par sérologie et par cible de leur toxine protéique (Lecadet *et al.*, 1999). Les toxines sont classées en fonction de leur séquence d'acides-amino (Crickmore *et al.*, 1998).

Les sérovars les plus utilisés sont: *B. thuringiensis kurstaki* contre les larves de lépidoptères défoliants, *B. thuringiensis aizawai* contre les larves de lépidoptères se nourrissant de graines et *B. thuringiensis san diego* et *B. thuringiensis tenebrionis* (= *morrisoni*) contre les larves de coléoptères. Finalement, *B. thuringiensis israeliensis*, est utilisé contre les moustiques vecteurs de maladies humaines (Bravo *et al.*, 2011).

Il existe une grande variété de toxines CRY appartenant à la classe des toxines formant pore (PFT) (Pigott & Ellar, 2007). La structure tridimensionnelle et le mode d'action détaillé ont fait l'objet de nombreuses études (voir Bravo *et al.*, 2011 pour une revue complète).

La transmission de Bt se fait par contamination d'une larve à une autre ou par une plante contenant la bactérie. Il n'a pas été détecté de transmission verticale (Raymond *et al.*, 2010).

Dans le cas de *B. sphaericus*, la toxine est localisée sur la membrane des spores et est relâchée par la digestion partielle de la bactérie dans le tube digestif. La toxine passe à travers la membrane péritrophique du tube digestif et tue la larve (Burgess, 1982, Singer, 1981). Les bactéries se multiplient dans l'hôte et sont libérées par sa désintégration. Depuis leur

introduction sur le marché pour contrôler les diptères, de nombreux cas de résistance ont été détectés (Miller *et al.*, 1983).

Saccharopolyspora spinosa a été découvert en 1982 dans un échantillon de sol provenant des Îles Vierges. Cet échantillon contenait une nouvelle espèce de micro-organisme GRAM positive, classifié comme un actinomycète. Les spinosynes sont extraites par fermentation de cette bactérie (Sparks *et al.*, 1998). Aujourd'hui, il y a de nombreuses formulations commercialisées sous la forme de deux agents actifs : le Spinosad® et le spinetoram. En France, le Spinosad® n'est pas considéré comme un agent de biocontrôle.

Le Spinosad® est un mélange de spinosynes A et D, les deux métabolites les plus actifs produits par ces espèces. Ce produit a été autorisé aux États-Unis en 1997 pour contrôler les larves de lépidoptères résistantes au pyrèthrinoïdes. Cet insecticide produit par la firme Dow Agrosience a été utilisé pendant de nombreuses années sur un nombre conséquent de ravageurs en Europe et dans le monde entier. De nos jours, il est utilisé dans 40 pays sur le coton, les crucifères, les fruits et les légumes pour contrôler plus de 50 ravageurs. Dix ans plus tard, en 2007, le spinetoram (mélange de composés J et L) a été autorisé aux États-Unis et au Canada après la découverte de preuves claires de résistance en laboratoire et en champ.

Les spinosynes sont actives aussi bien par contact que par ingestion, l'infection par contact étant 5 à 10 fois moins efficace. Une fois ingérées par l'insecte, les spinosynes atteignent rapidement le système nerveux central où elles induisent la dépolarisation de la membrane neuronale connectée aux muscles. Les spinosynes se fixent à un site spécifique sur le récepteur acétylcholine (nAChR), différent des récepteurs nicotinoïdes (Sparks *et al.*, 2012).

1.3.3.2.2.1.3. Virus

Des virus appartenant à plusieurs familles ont été identifiés pour leur pouvoir pathogène envers les arthropodes. Parmi eux, plusieurs virus appartenant à la famille des baculovirus sont utilisés en tant qu'agents de bio-contrôle. (Tableau 1.3) (Dent, 1991; Suty, 2010).

Les baculovirus et leur mode d'action seront détaillés dans les paragraphes suivants.

1.3.3.2.2.2. Médiateurs chimiques

Une autre alternative aux pesticides chimiques est la diffusion de phéromones des insectes cibles. Cette diffusion peut avoir deux buts : attirer les mâles dans des pièges, ou inonder la culture avec des phéromones induisant une incapacité pour les mâles à identifier la localisation des femelles, d'où une réduction des pontes fertiles, et donc du nombre d'insectes à la génération suivante (Wright, 1965). Cette technique est utilisée contre de nombreux ravageurs de l'ordre des lépidoptères. Contre les coléoptères, des phéromones d'agrégation sont utilisées pour le piégeage. Celles-ci sont normalement émises par les mâles mais attirent les deux sexes ce qui permet de piéger l'ensemble de la population de ravageur. Ces phéromones sont souvent couplées avec des kairomones (substances produites par la plante hôte) lors de la formulation, celles-ci agissant en synergie avec les phéromones d'agrégation.

1.4. Diminution de l'efficacité des méthodes de protection

Entre populations d'un insecte donné, des variations dans l'efficacité d'un insecticide sont fréquentes. Ces variations sont sous contrôle multigénique, et permettent un certain niveau de tolérance au produit cible. Elles préexistent à l'utilisation du produit. Le processus biologique aboutissant à cette tolérance est souvent difficile à déterminer.

L'utilisation massive et répétée du même outil de protection des cultures peut conduire à une baisse de leur efficacité due à l'apparition d'organismes résistants mais aussi à la modification de comportement de certains ravageurs. Dans ce cas, il s'agit en général d'une modification au niveau d'un ou de quelques mécanismes, qui traduisent la modification d'un ou quelques gènes.

1.4.1. Changement de comportement de l'hôte

L'utilisation d'une méthode de protection contre un ravageur va induire un fort stress pour ce dernier et conduira à l'émergence d'une variabilité pour contrer ce stress. Cette variabilité est appelée plasticité phénotypique. West-Eberhard (2003) la définit comme « [...] l'habilité d'un organisme à réagir à un changement environnemental avec une modification de forme, d'état, de mouvement ou d'activité [...] ». Suivant ce modèle, des cas de résistances ont été détectés

par modification du comportement des hôtes face à la pression des pesticides (Lockwood *et al.*, 1984) mais ils restent assez peu étudiés.

C'est, par exemple, le cas de *Drosophila melanogaster* qui est capable de résister à l'acroléine en réduisant son entrée dans l'organisme par la réduction de ses exigences respiratoires (Sierra *et al.*, 1989).

Des cas de résistances peuvent être liés à la mobilité de l'insecte. Ainsi, chez le diptère *Haematobia irritans*, le contact avec la deltaméthrine ou la perméthrine va augmenter la mobilité de l'insecte, d'où une minimisation du temps de contact avec l'insecticide (Lockwood *et al.*, 1984). Une diminution de l'activité locomotrice peut aussi être un mécanisme viable pour diminuer le contact avec le pesticide. Ainsi au contact d'un pyréthrianoïde, la baisse de mouvement de la larve de *Heliothis virescens* est un mécanisme de résistance lui évitant d'entrer en contact avec le pesticide (Sparks *et al.*, 1989).

Les larves de scarabées peuvent éviter l'infection par des nématodes en les éliminant directement de leur bouche (Narayanan, 2004).

Il a été montré chez le moustique *Anopheles gambiae* qu'après de nombreux traitements des habitations à l'hexachlorocyclohexane (HCH), le moustique était toujours présent en abondance mais n'était presque jamais rencontré dans les habitations, même non traitées, et ne se nourrissait plus qu'au dépend du bétail et non de l'homme (Muirhead-Thomson, 1960).

D'autre part, il a été montré au Brésil une résistance des larves de *Plutella xylostella* à Bt car les femelles choisissent des surfaces sans Bt pour pondre, réduisant le nombre d'œufs pondus sur les surfaces traitées, ceci étant corrélé avec la résistance (Zago *et al.*, 2014)

1.4.2. Résistance de l'hôte

La résistance de l'hôte a des causes multiples : il existe des résistances dues au système immunitaire de l'insecte et celles développées au contact de l'agent de contrôle.

1.4.2.1. Résistances aspécifiques

Les insectes possèdent un système immunitaire qui met en œuvre de nombreux mécanismes leur permettant de survivre face aux agresseurs. Ces mécanismes sont très peu connus. Peu de preuves existent d'une immunité « acquise » comme chez les vertébrés mais des exemples ont été mis en évidence chez différents organismes (e.g. Zangh & Loker, 2004 ; Brandt *et al.*, 2004 ; Agaisse, 2007). Les réactions immunitaires « innées » ont, par contre, été largement observées sous la forme de barrières mécaniques comme les membranes, la cuticule ou encore le pH intestinal mais aussi sous forme de réactions cellulaires telles l'encapsulation ou la phagocytose. Ces réactions complexes impliquent l'activation de cascades enzymatiques et de diverses protéines (Engstrom *et al.*, 1984 ; Franc & White, 2000 ; Narayanan, 2004). Ici, seuls les mécanismes caractéristiques des infections virales seront abordés.

Le premier de ces mécanismes est l'apoptose, aussi appelé mort cellulaire programmée. Elle permet le renouvellement des cellules, mais peut aussi être activée en cas de détection de cellules infectées, comme en cas d'infection virale où ces réactions augmentent fortement, ce qui permet l'élimination des cellules infectées et empêche la multiplication et la propagation du virus dans l'organisme de l'hôte (Clarke & Clem, 2003). Un phénomène proche est la nécrose cellulaire, qui consiste en une réponse cytotoxique de la cellule elle-même (da Silveira *et al.*, 2007). L'immunité cellulaire est un mécanisme de défense assuré par les cellules sanguines appelées hémocytes. Leur rôle est de bloquer la prolifération de l'infection et consiste à la fois en l'encapsulation des organismes étrangers et en la sécrétion d'enzymes permettant de les détruire (Trudeau *et al.*, 2001 ; Washburn *et al.*, 1996) ou, dans certains cas, d'effectuer des mécanismes de phagocytose (Lavine & Strand, 2002 ; Ribeiro & Brehelin, 2006). Pour plus de détails sur ces mécanismes, se référer à la review de Strand (2008). Un autre mécanisme de défense est la mélanisation. Elle permet de piéger les parasites ou pathogènes par encapsulation (Gotz & Vey, 1974 ; Hung *et al.*, 1993 ; Reeson *et al.*, 1998 ; Washburn *et al.*, 1996). L'enzyme principale de la mélanine est la phénoloxydase, oxydant les dérivés de la tyrosine en quinones, formant alors la mélanine (Gotz & Boman, 1985). Ce phénomène est très important pour l'immunité de l'insecte et permet d'inhiber le développement de l'infection. Les hormones jouent aussi un rôle important dans les défenses face aux pathogènes. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la tolérance aux pathogènes était corrélée au développement larvaire (Boucias *et al.*, 1980 ; Kirkpatrick *et al.*, 1998) et que l'augmentation de la tolérance des stades larvaires avancés pouvait être due à une maturation du système immunitaire corrélée dans le

temps avec la sécrétion d'hormones (Meister & Richards, 1996 ; Sun *et al.*, 1990). Certaines de ces hormones semblent même avoir un réel rôle dans l'immunité comme l'ecdysone chez la drosophile (Meister, 2000 ; Sorrentino *et al.*, 2002), l'hormone juvénile chez *Spodoptera littoralis* (Khafagi *et al.*, 2001) et même les neurotransmetteurs chez *Manduca sexta*, régulant les fonctions immunitaires (Adamo & Shoemaker, 2000).

1.4.2.2. Résistances spécifiques

Le développement de résistances aux molécules insecticides pures (chimiques ou biologiques) est en général associé à une ou plusieurs mutations dans le gène ciblé (enzyme, récepteur, ...). Même si les modes d'action ne sont pas similaires, le processus de sélection répond aux mêmes lois. Ainsi, Bodereau-Dubois *et al.* (2012), indiquent que toutes les mutations impliquant des modifications sur le site de fixation des nicotinoïdes et néonicotinoïdes dans les nAChRs, sont une source potentielle de résistance. Certaines mutations génèrent des résistances seulement à certains type de nicotinoïdes comme démontré avec le nitenpyrame (Perry *et al.*, 2008). Lorsque deux insecticides agissent sur le même processus physiologique chez l'hôte, il est possible d'avoir des résistances croisées. C'est par exemple le cas du DDT et des pyréthroïdes, où certaines résistances croisées ont été détectées très rapidement après l'introduction de ces derniers (Lloyd, 1969). Une liste des mutations du gène codant pour les canaux sodium, conférant la résistance de type « knockdown » aux pyréthroïdes a été publiée par Soderlund (2003). L'émergence des différentes mutations est corrélée à une forte pression de sélection. Les pyrèthres naturels, beaucoup moins stables et efficaces que les pyréthri-noïdes, seront incapables de contourner cette résistance déjà largement implantée dans le paysage agricole actuel. Il sera seulement possible de les utiliser dans le cas où le ravageur ciblé ne présentera aucune résistance préétablie.

Le développement de résistances n'est pas limité seulement aux produits de synthèse. Au moins 27 espèces d'insectes montrent une résistance en laboratoire à des protéines de Bt purifiées. La plupart de ces résistances concernent les Lépidoptères. À ce jour, trois espèces ont montré une résistance aux formulations à base de Bt appliquées en champs : *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994 ; Wang *et al.*, 2007), *Trichoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003) et *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). Beaucoup d'autres espèces sont capables de développer des résistances sous la pression de Bt en laboratoire comme *Heliothis virescens* (Macintosh *et al.*, 1991).

Une revue récente sur le développement de résistance aux cultures génétiquement modifiées par insertion d'un gène de toxine de Bt indique que ce type de résistance a été détecté dans 5 des 13 populations naturelles de ravageurs majeurs (Tabashnik, 2013). Les mécanismes de résistance à Bt sont extrêmement diversifiés, comme des altérations des récepteurs primaires et secondaires, des altérations du transporteur ABC, ou encore une altération des récepteurs APN ou des protéases digestives.

Les premiers signes d'apparition de résistances aux spinosynes ont été mis en évidence en laboratoire sur des populations de *Heliothis virescens* (tordeuse du tabac) et *Musca domestica* (mouche domestique). Par la suite, d'autres résistances ont été identifiées comme chez *Drosophila melanogaster* (mouche des fruits), *Liriomyza trifolii* (mouche mineuse américaine), *Helicoverpa armigera* (noctuelle de la tomate), *Plutella xylostella* (teigne des crucifères), *Frankliniella occidentalis* (thrips des petits fruits) et *Spodoptera exigua* (noctuelle de la betterave). Tous ces ravageurs présentent des niveaux de résistance très variables, en champ comme en laboratoire (Sparks *et al.*, 2012). Selon ces auteurs, six espèces d'insectes montrent une résistance aux spinosynes en champ. Parmi ces six espèces, on retrouve deux diptères (*Bactrocera oleae* et *Liriomyza trifolii*), trois lépidoptères (*Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua* et *Helicoverpa armigera*) et une espèce de thysanoptère (*Frankliniella occidentalis*). Les niveaux de résistance sont, par contre, beaucoup plus forts pour *Plutella xylostella* et *Frankliniella occidentalis* comparés aux autres espèces.

Dans la plupart des cas, le développement de la résistance est le résultat d'une forte pression de sélection exercée par l'insecticide sur les populations d'insectes suite à une utilisation très importante des spinosynes (Sayyed *et al.*, 2004). Par exemple, *Plutella xylostella* est devenu résistant aux spinosynes en seulement deux ans à Hawaï. Le produit avait été mis sur le marché Hawaïen en 1998 pour contrôler ce ravageur, déjà résistant à certains insecticides synthétiques. En très peu de temps, le Spinosad[®] est devenu la méthode de contrôle la plus utilisée contre ce ravageur. Entre 2000 et 2002, des tests de sensibilité ont montré une résistance aux spinosynes sur la totalité de l'île d'Hawaï.

Dans un souci de gestion des résistances, le Spinosad[®] fut retiré du marché Hawaïen et remplacé temporairement par d'autres insecticides avant d'être réintroduit deux ans plus tard. Après cette réintroduction, des individus résistants ont rapidement refait leur apparition dans certaines zones de l'île (Zhao *et al.*, 2002). Il semblerait que l'apparition de résistance soit,

cette fois-ci, due à la monoculture de crucifères sur lesquels ont été réalisés des traitements répétés de Spinosad[®] sur une population de *P. xylostella*.

Quelques études ont montré que le développement de résistances est possible lors de traitements répétés avec de l'azadirachtine sur des populations de pucerons du pêcher (Feng & Isman, 1995). Après 40 générations, aucun signe de résistance chez les pucerons traités à l'huile de neem n'a été observé, alors que ceux traités seulement à l'azadirachtine purifiée présentaient une résistance 9 fois supérieure comparée aux pucerons non traités. Dans des conditions extrêmes, cette résistance est équivalente à une faible/moyenne résistance qui peut être atteinte en champ en 4 ou 5 ans avec un traitement exclusif, les pucerons produisant un maximum de 12 générations par an. L'absence de résistance à l'huile de neem s'explique par la multitude de molécules différentes et la variété de leurs modes d'action. (Voir paragraphe 1.3.3.2.2.1. Substances naturelles).

De la même façon, il n'y a, à ce jour, pas de résistance à la bactérie *B. thuringiensis* « entière ». Lorsqu'un insecte résistant à une des protéines est mis en contact avec une culture de *B. thuringiensis*, il finit par mourir, la grande diversité de produits toxiques sécrétés par la bactérie ne pouvant pas être contrôlée par l'hôte.

La résistance aux baculovirus et les moyens de la contourner étant le sujet de cette thèse, ils seront traités en détail dans la deuxième partie de ce chapitre.

En ce qui concerne les pathogènes ou parasites pluricellulaires (champignons et nématodes), les mécanismes impliqués dans des résistances relèvent souvent du renforcement des barrières à la pénétration ou de la défense immunitaire, les réactions d'encapsulation et de mélanisation jouant un rôle prépondérant dans ces mécanismes de défense (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013 ; Poinar, 1971).

Il existe aussi des exemples de réduction de sensibilité aux parasitoïdes des insectes hôtes, au laboratoire et en champ.

En laboratoire, il a été montré que le puceron vert du pois (*Acyrtosiphon pisum*) présentait des variations de résistance au parasitisme de la guêpe parasitoïde *Aphidius ervi* aussi bien au sein des mêmes populations que dans des populations différentes (Henter & Via, 1995 ; Hufbauer & Via, 1999). Un autre exemple est l'évolution de la résistance du charançon *Hypera postica*

présentant une augmentation du taux d'encapsulation du parasitoïde *Bathyplectes curculionis* au cours du temps (Berberet *et al.*, 2003).

En champ, il a été montré que des plantes étaient capables d'affecter directement les parasitoïdes, en réduisant ou augmentant leur capacité à localiser les hôtes, ou indirectement en affectant la valeur sélective des herbivores et, par conséquent, celle des parasitoïdes. De tels résultats ont été reportés par Caron *et al.* (2008) en utilisant trois plantes hôtes différentes et en analysant la relation entre *Trichoplusia ni* (herbivore polyphage) et un parasitoïde généraliste, *Compsilura concinnat*.

Un autre exemple est l'influence de métabolites secondaires de plantes (acide hydroxamique (Hx)) sur la taille du puceron *Aphidius rhopalosiphi* impactant le succès de prédation de parasitoïdes (Fuentes-Contreras & Niemeyer, 1998).

Une variation spatio-temporelle dans le parasitisme des œufs d'*Helicoverpa* par un Trichogramme dans un champ de coton transgénique (Bt) a aussi été reportée par Davies *et al.* (2011). Cette étude montre que le taux de parasitisme peut être différent, en fonction de la localisation dans la plante hôte et décrit des différences entre champs, au sein d'un même champ et entre plantes, indiquant qu'une différence de sensibilité ne serait pas juste causée par la dynamique spatiale de l'hôte.

Il ressort de l'analyse de ces différents cas que plus l'agresseur (substance, extrait, parasite, pathogène) est complexe, plus il est difficile pour l'hôte de développer une résistance.

2. Développement industriel de bio-insecticides

La croissance annuelle des pesticides chimiques est en chute depuis les années 80. Cela est dû à la saturation du marché, à l'émergence de produits génériques et au renforcement des politiques environnementales. Au contraire, les insecticides d'origine biologique sont encore en croissance. Entre 2005 et 2010 la part de marché des pesticides synthétiques a baissé de 1,5% (26 076 M\$ à 24 205 M\$). Dans la même période la part de marché des bio-pesticides a augmenté de 9,9% (672 M\$ à 1 121 M\$) (Tanwar *et al.* 2012). L'estimation pour 2015 est de 2 000 M\$, représentant une hausse de 90% par rapport à 2010 (Tanwar *et al.* 2012).

Dans les années 90, les produits à base de Bt comptaient pour 95% du marché global de bio-insecticides. En 2006, pour tous les types de cultures, les bio-insecticides bactériens occupaient 74% du marché (dont 60% pour le seul Bt, les bio-pesticides fongiques pour 10%, les insecticides viraux, 5%, les prédateurs naturels, 8%, et les autres bio-insecticides, 3% (Thakore 2006)). La palette d'agents de bio-contrôle disponibles sur le marché augmente régulièrement et cette tendance devrait se poursuivre dans les prochaines années du fait de leur diversité.

Un des problèmes majeurs des bio-pesticides est leur manque de robustesse et le haut niveau technologique requis pour les utiliser (Ravensberg, 2011). De plus, les bio-pesticides ont la réputation d'être très coûteux, et souvent, peu fiables. En effet, ces produits sont généralement plus sensibles aux hautes températures, à l'humidité ou aux radiations solaires que leurs homologues synthétiques. Ils doivent être utilisés dans des conditions très précises et ont une faible durée de vie. Ils présentent une très faible persistance dans l'environnement du fait de leur bonne biodégradabilité. Cette propriété peut être considérée comme une qualité car cela réduit leur persistance dans l'environnement et limite les pressions de sélection sur les bio-agresseurs, d'où une réduction de l'apparition de résistances. Dans la réalité du champ, cela oblige à effectuer des pulvérisations plus fréquentes pour maintenir un niveau de contrôle acceptable. Cette augmentation des quantités de produits utilisés dans l'environnement rend la lutte biologique moins compétitive du point de vue économique. Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été conduites pour constamment augmenter l'efficacité, la facilité d'utilisation et la persistance de ces produits.

La variabilité dans la qualité des produits a aussi été un problème majeur dans le développement des bio-insecticides, mais le besoin absolu de contrôles qualité pour standardiser les lots est maintenant reconnu et incorporé dans le système de production. (Ravensberg, 2011, Glare *et al.*, 2012). Cette amélioration de la qualité finale (et donc de l'efficacité du produit) se fait à deux niveaux : lors de la production ou lors de la formulation.

De nombreuses fonctions à la formulation existent : stabilité du produit, applications efficaces, facilité et sécurité d'utilisation, et meilleure persistance après application (Ravensberg, 2011). Les technologies de formulation ont permis d'améliorer la distribution, la durée de vie et l'efficacité en champ des bio-pesticides, et ce en ajoutant différents composés à l'agent actif (Ravensberg, 2011, Leggett *et al.*, 2011).

Bien qu'il y ait peu d'informations sur les recherches dans ce domaine en raison de problèmes de concurrence, de nombreuses technologies disponibles fournissent des options prometteuses.

Les micro-organismes ne formant pas de spores (e.g. *Serratia* spp.) sont sensibles aux fortes températures et à la dessiccation et ont naturellement été considérés trop instables pour être utilisés. Cependant, certains ont pu être employés avec succès comme les produits basés sur *Metarhizium acridium* pour le contrôle des criquets et des sauterelles (Hunter, 2010). Les formulations peuvent aussi être utilisées pour améliorer une caractéristique précise des bio-pesticides. Par exemple, *B. thuringiensis israelensis* a été formulé en granules à libération lente qui ciblent les espèces de moustiques se nourrissant en haut, au centre ou en bas des masses d'eau (Lacey, 2007).

L'activité, sur des plantes ou dans le sol, de bio-pesticides produits à partir d'organismes vivants, et/ou de leurs agents actifs, dépasse rarement quelques jours. La biodégradabilité des microorganismes évite de possibles dégâts environnementaux et des impacts envers les espèces non-cibles mais entraîne aussi un manque d'activité persistante. En cas d'application sur feuillage, la persistance maximum est de 14 jours. Arriver à une persistance de 21 jours (déjà possible avec quelques bio-pesticides) constituerait une grande avancée et pourrait être un objectif clé de recherche de futures formulations (Glare *et al.*, 2012). Une telle persistance a été démontrée avec quelques antagonistes microbiens de maladies fongiques appliqués au feuillage (Kohl *et al.*, 1998).

Pour les applications foliaires, des avancées dans les technologies de pulvérisation peuvent augmenter l'efficacité de contrôle (Nuyttens *et al.*, 2009), comme l'optimisation de la taille des gouttelettes pour assurer une meilleure couverture de l'agent actif, tel que cela a été fait pour de nombreux produits à base de Bt.

Tableau 1.5. Bio-insecticides commercialisés formulés à base de baculovirus. Ces données ont été compilées d'après Berling, 2009; Yang *et al.*, 2012; Beas-Catena *et al.*, 2014; Eberle *et al.* 2012. Certains des produits mentionnés sont des productions locales expliquant l'absence de formulation connue. Cette liste n'est pas exhaustive.

Virus	Ravageur(s) ciblé(s)	Culture	Nom commercial	Entreprise(s)
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Principales cultures	Baculovirus Nitral®	Nitral Urbana Laboratorios Ltda, Brésil
			Coopervirus PM®	Coodetec, Brésil
			Protege®	Milenia Agrociencias S.A.,Brésil
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> ,	Principales cultures	VPN80®	Agricola El Sol, Guatemala

Virus	Ravageur(s) ciblé(s)	Culture	Nom commercial	Entreprise(s)
	<i>Estigmene acrea</i> <i>Heliothis virescens, Plutella xylostella</i> <i>Pseudoplusia includens, Spodoptera exigua,</i> <i>Trichoplusia ni</i>	Légumes	---	Chine (3 producteurs)
AdorGV	<i>Adoxophyes orana</i>	Vergers	Capex®	Andermatt Biocontrol, Suisse
AfNPV	<i>Anagrapha falcifera</i>	Légumes	CLV-LC®	Certis, USA
AsGV	<i>Agrotis segetum</i>	Légumes	Agrovir®	Agrovir, Hongrie
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Soja	Baculo-Soja® Multigen® Baculovirus Nitral® Coopervirus PM® Protege® ---	Nova Era Biotecnologia Agricola Ltda. Brésil Brésil Brésil Brésil Argentine, Mexique
BusuNPV	<i>Buzura suppressaria</i>	Thé	---	Chine (1 producteur)
CIGV	<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	Vergers	Cryptex®	Andermatt Biocontrol, Suisse
CpGV	<i>Cydia pomonella</i>	Vergers	Carpovirusine® Carpovirus Plus® Cyd-X® Granupom® Madex® VirosoftCP4® Virex®	NPP, Arysta Lifescience, France INTA, Argentine Certis, USA Biobest, Belgique Andermatt Biocontrol, Suisse Biotepp Inc, Canada Biocolor, Espagne
EcobNPV	<i>Ectropis obliqua pulina</i>	Thé	---	Chine (1 producteur)
???NPV	<i>Euproctis pseudoconspersa</i>	Thé	---	Chine
GyruNPV	<i>Gynaephora spp</i>	Pâturage	---	China (1 producteur)
HearNPV	<i>Helicoverpa armigera</i>	Coton, tomates, Poivre, tabac	Helicide™® Helicovex® Virin-H® Helocide® Biovirus-H® Helicop® Heligard® Vivus Gold®	PCIL, Inde Andermatt Biocontrol, Suisse Inde PCIL, Inde BIL, Inde Inde MBPL, Inde Australie

Virus	Ravageur(s) ciblé(s)	Culture	Nom commercial	Entreprise(s)
			Heliocide®	Australie
			Vivus Max®	Australie
			---	Chine (11 producteurs), Vietnam, Thaïlande
HzNPV	<i>Helicoverpa spp.</i>	Principales cultures	GemStar LC®	Certis, USA
			Vivus®	Australie
			Gemstar®	Rhone Poulenc rural Australie
HycuNPV	<i>Hyphantria cunea</i>	Forêt	Virin-ABB®	Russie
LeseNPV	<i>Leucania separata</i>	blé, maïs		Chine (1 producteur)
LdNPV	<i>Lymantria dispar</i>	Forêt	Disparvirus®	Corporation CCIP Inc., Canada
			Gypcheck®	USA
MabrNPV	<i>Mamestra brassicae</i>	Légumes	Mamestrin®	USA et Japon
			Virin EKS®	Russie
MacoNPV	<i>Mamestra configurata</i>		Virossoft®	Andermatt Biocontrol, Certis, Suisse
MyseNPV	<i>Mythimna separata</i>	Riz	---	Chine
MyseGV	<i>Mythimna separata</i>	Riz	---	Chine
NeabNPV	<i>Neodiprion abietis</i>	Forêt	Abietiv®	Corporation CCIP Inc., Canada
NeleNPV	<i>Neodiprion lecontei</i>	Forêt, Ornementales	Lecontvirus®	Corporation CCIP Inc., Canada
	<i>Neodiprion sertifer</i>	Forêt	Monisärmiövirus®	
OpMNPV	<i>Orgyia leucostigma</i>	Forêt	TM Biocontrol-1®	Corporation CCIP Inc., Canada
	<i>Orgyia pseudotsugata</i>	Ornementales	Virtuss®	
PhopGV	<i>Phthorimaea operculella</i>	Pomme de terre	Baculovirus Corpoica®	Vecol, Colombie
	<i>Tecia solanivora</i> (<i>Symmestriscema tangolias</i>)		Matapol Plus®	PROINPA, Bolivie
PiraGV	<i>Pieris rapae</i>	Légumes	---	Chine (1 producteur)
PIGV	<i>Plodia interpunctella</i>	Raisins stockés et amandes	FruitGuard®	USA
PxGV	<i>Plutella xylostella</i>	Légumes, blé, maïs	---	Chine
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i>	Principales cultures	Spexit®	Andermatt Biocontrol, Certis, Suisse
	<i>Spodoptera littoralis</i>	Légumes	Spodo-cide®	PCIL, Inde
			Spod-X®	USA
			VIR-EX®	Biocolor, Espagne
			---	Thaïlande, Chine
SaMNPV	<i>Diaphania hyalinata</i> , <i>Spodoptera albula</i> (sunia),	Principales cultures	VPN82®	Agricola El Sol, Guatemala

Virus	Ravageur(s) ciblé(s)	Culture	Nom commercial	Entreprise(s)
	<i>Spodoptera exigua</i>			
SaMNPV +	Voir liste sur cette page :	Principales cultures	VPN Ultra®	Agricola El Sol, Guatemala
AcMNPV	http://www.agricolaelsol.com/	Légumes		
SpliNPV	<i>Spodoptera littoralis</i>	Principales cultures Légumes	Littovir®	Andermatt Biocontrol, Suisse
SpltNPV	<i>Spodoptera litura</i>	Coton, Légumes, Riz	Spodocide® Spodi-cide® Spodopterin® Biovirus-S® ---	PCIL, Inde Inde Inde BIL, Inde Chine, Thaïlande, Vietnam

En Chine on dénombre 40 ravageurs du thé différents et 63 espèces de virus en ont été isolés, dont 38 espèces de NPV, 17 espèces de GV, et 5 espèces de CpV (Cypovirus). Les NPV de la tordeuse du thé ont atteint un niveau record d'application à grande échelle.

(<http://resources.alibaba.com/topic/800109324/Pollution-free-tea-production-in-the-pest-control-measures.h>)

Quel est l'intérêt de développer des bio-insecticides face aux problèmes rencontrés ? Le [tableau 1.6.](#) présente une comparaison des performances entre les insecticides chimiques et biologiques. Ces derniers sont ainsi beaucoup plus faciles et abordables à développer. L'un des paramètres les plus importants, le risque d'apparition de résistances, est, lui aussi, à l'avantage des bio-pesticides.

Tableau 1.6. Comparaison de données sur les performances des agents de contrôle chimiques et biologiques (d'après Van Lenteren, 1997).

	Agent chimique	Agent biologique
Nombre d'ingrédients testés	> 1 million	2000
Taux de réussite	1 : 200000	1 : 10
Coût de développement	400 million US\$	2 million US\$
Rapport bénéfice / coût	2 : 1	20 : 1
Risques de résistance	Important	Faible
Spécificité	Très faible	Très forte
Effets secondaires nocifs	Beaucoup	Aucun/peu

3. Le modèle d'étude : Le carpocapse des pommes et le virus de la granulose

3.1. Le carpocapse des pommes

Le carpocapse des pommes ([Figure 1.4](#)) est le principal ravageur des vergers de pommiers, poiriers et noyers en climat tempéré. Il est originaire, comme le pommier, de l'Asie Mineur et du Caucase. Le carpocapse a probablement colonisé l'Amérique avec l'extension de la culture du pommier. Les premiers pommiers d'Amérique ont été plantés autour de 1620 sur la côte est des USA et du Québec. Dès 1796 des cultivars spécifiques des USA sont décrits comme la variété McIntosh (Kellerhals, 2009). Peu de temps après on trouve des pommes au Mexique. Le carpocapse a aujourd'hui une zone de répartition très large ([Figure 1.5](#)), ce qui fait de lui un ravageur d'ordre économique mondial. Les larves du carpocapse forent le fruit et pénètrent à l'intérieur pour se nourrir. Les fruits deviennent alors impropres à la consommation. Il a été

montré que, lors des années de fortes infestations, les pertes de rendement à la récolte dues au carpocapse pouvaient atteindre 80 %.



Figure.1.4. Représentations du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella*) (A) Carpoapse adulte (B) Larve de carpocapse au stade 1 (C) Pomme atteinte par le carpocapse. Photo : INRA (<http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/3cydpom.htm>).

Le cycle de vie du carpocapse est dépendant de la température, (Howell & Neven, 2000; Riedl & Croft, 1978) et les larves matures passent l'hiver en diapause dans un cocon d'hibernation, dans les fissures de l'écorce ou dans le sol. Le cycle complet du carpocapse est présenté en [figure 1.6](#). Les conditions locales ainsi que la plante hôte vont fortement influencer le développement de l'insecte ainsi que son nombre de générations (Audemard, 1991). Ainsi, des modifications climatiques ou le changement de variétés vont modifier le nombre de générations de l'insecte par an. C'est ce qui s'est passé, par exemple, dans le sud de la France avec une nouvelle génération par an et un développement plus rapide des individus (Léssel, 2004). L'augmentation du nombre de générations annuelles a conduit à une accélération de l'apparition d'individus résistants (Tabashnick & Croft, 1982), en particulier dans cette région (Martinet, 1996).

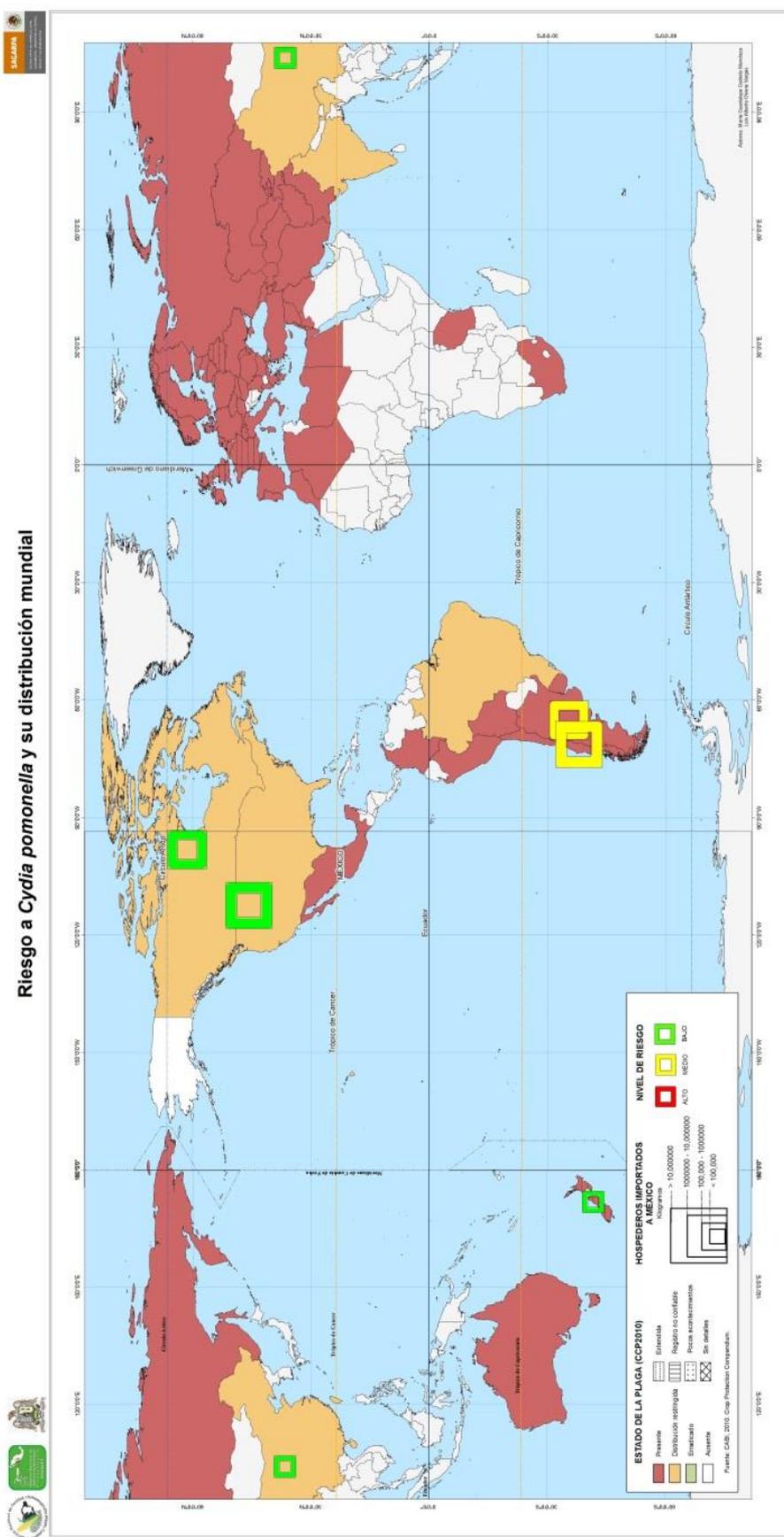


Figure 1.5. Répartition géographique du carpocapse des pommes (*Cydia pomonella* L.) en 2010. Les couleurs représentent le niveau d'infestation, de blanc (ravageur absent) à rouge (ravageur présent). Les carrés de couleurs représentent les risques d'infestation. Source : <http://portal.sinavef.gob.mx/MapasInternacionales.html> (consulté le 24 sept 2014).

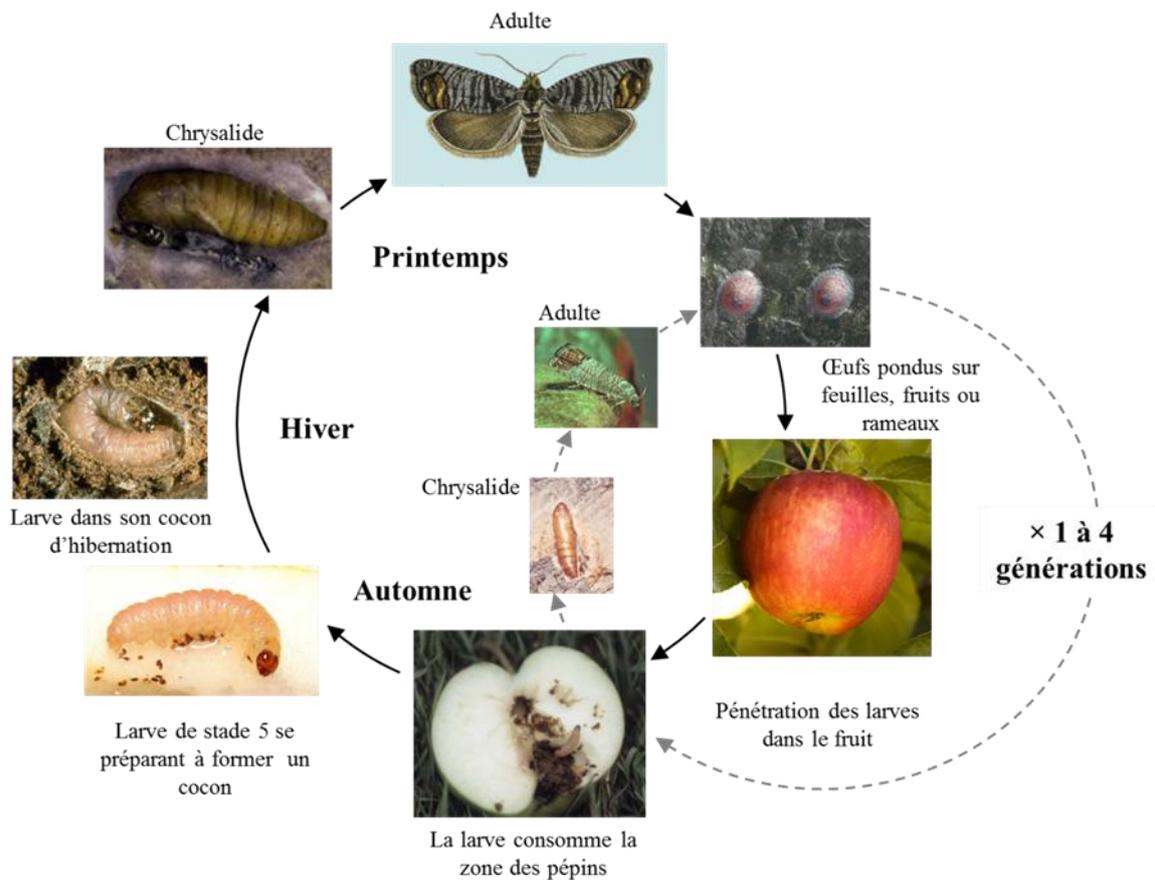


Figure 1.6. Cycle annuel de *Cydia pomonella*. L'insecte réalise entre une et quatre générations par saison, en fonction du climat.

Une fois la larve à l'intérieur du fruit, elle est protégée : les traitements de surface seront dès lors inefficaces. Il est donc nécessaire d'agir avant la pénétration des larves néonates dans le fruit, soit en empêchant la ponte ou l'éclosion des œufs, soit en attaquant la larve à la sortie de l'œuf. Comme la fenêtre d'action est étroite, il est nécessaire de multiplier les traitements. Les pommes sont parmi les fruits qui demandent le plus de traitements phytosanitaires (en moyenne 36 traitements par an (source : INRA)). Le carpocapse a progressivement développé des résistances à la plupart des insecticides chimiques. Les premières résistances à l'arséniate ont été mises en évidence au début du 20^{ème} siècle (Hough, 1928), puis au DDT dans les années 1950 (Cutright, 1954). *Cydia pomonella* a ensuite développé des résistances à tous les groupes d'insecticides partout dans le monde: aux organophosphorés (Bush *et al.*, 1993 ; Knight *et al.*, 1994 ; Reuveny & Cohen, 2004 ; Soleno *et al.*, 2008), aux benzoylurées (incluant le difluobenzuron) (Misfit *et al.*, 1988 ; Sauphanor *et al.*, 1998 ; Charmillot *et al.*, 1999 ; Sauphanor *et al.*, 2000 ; Pasquier & Charmillot, 2003), aux diacylhydrazines

(tebufenozide et methoxyfenozide) (Mota-Sanchez *et al.*, 2008) et aux pyrethriinoïdes (Sauphanor *et al.*, 2000 ; Mota-Sanchez *et al.*, 2008 ; Sauphanor *et al.*, 1997).

Une méthode de contrôle biologique contre ce ravageur, développée depuis les années 70, est basée sur l'utilisation du virus de la granulose du carpocapse.

3.2. Les baculovirus

3.2.1. Structure

Le virus de la granulose du carpocapse appartient à la famille des baculovirus.

Il existe trois familles de virus dont les membres infectant les insectes, produisent des corps d'inclusion : les baculovirus, les poxivirus et les réovirus (Hajek, 2004). Les deux derniers possèdent aussi des espèces capables d'infecter les vertébrés. Les baculovirus n'infectent que des arthropodes, principalement les insectes. Même s'il a été montré que certains baculovirus sont capables d'entrer dans des cellules de vertébrés, ils ne produisent pas d'effet pathogène et ils ne sont pas capables d'initier le cycle viral. Quelques cas d'infection de vertébrés par des baculovirus ont été constatés mais ceux-ci n'étaient pas pathologiques (Cheng *et al.* 2004 ; Cummins, 2003). Aucun test, que ce soit par manipulation de baculovirus par l'humain (Mazzone & Tignor, 1976) ou ingestion (Chauthani *et al.* 1968) n'a provoqué d'infection productive. En infection de cellules *in vitro* par des formes virales bourgeonnantes différentes, aucun épisode de transcription, réplication ou expression de protéines virales n'a été observé (Carbonell *et al.*, 1985 ; Carbonell & Miller, 1987). Tous ces tests ont prouvé la spécificité des baculovirus aux insectes ainsi que leur incapacité à se répliquer dans les vertébrés, les rendant acceptables du point de vue du risque sanitaire pour leur utilisation en lutte biologique.

Les baculovirus forment une très grande famille de virus, pour la plupart isolés à partir de lépidoptères. Quelques-uns ont cependant été isolés sur d'autres ordres comme l'unique baculovirus de diptère isolé sur un moustique (Becnel *et al.*, 2001 ; Moser *et al.*, 2001), sur des hyménoptères comme *Neodiprion sertifer* (Lauzon *et al.*, 2006) ou même sur des crustacés (Lester *et al.*, 1987). Ce sont des virus à ADN double brin circulaire (Rohrman, 2013) dont la taille est comprise entre 90 et 180 Kb selon les espèces. Ils sont très spécifiques et parasitent une seule espèce d'insecte ou quelques espèces proches mais du même genre.

Une exception existe: l'Autographa californica nucléopolyhédrovirus, AcMNPV, qui est capable d'infecter plus de 33 espèces de 7 familles de Lépidoptères (Groner, 1986 ; Bishop *et al.*, 1995). La famille des *Baculoviridae* se subdivise en 4 génomes en accord avec le comité international de taxonomie des virus (release 2013, EC45) : les *Alphabaculovirus* regroupant les nucléopolyhédrovirus spécifiques des lépidoptères (Autographa californica MNPV...), les *Betabaculovirus* composés des granulovirus spécifiques des lépidoptères (CpGV...), les *Gammabaculovirus*, nucléopolyhédrovirus spécifiques des hyménoptères (*Neodiprion lecontei* NPV) et les *Deltabaculovirus* comprenant le seul nucléopolyhédrovirus spécifique de diptère (*Culex nigripalpus* NPV).

Ces virus se répliquent dans le noyau de la cellule hôte, d'où le nom de virus de polyhédrose nucléaire pour trois des génomes de cette famille. Le génome viral est condensé grâce à la protéine P6.9, présente chez tous les baculovirus (Van Oers & Vlak, 2007 ; Wang *et al.*, 2007) et enfermé dans une nucléocapside dont le composant majoritaire est la protéine VP39 (Pearson *et al.*, 1988 ; Thiem & Miller, 1989). La nucléocapside a une structure de symétrie hélicoïdale qui confère au baculovirus une forme de bâtonnet (*baculum* en latin) d'un diamètre de 30 à 60 nm et d'une longueur de 250 à 300 nm variant en fonction de la taille du génome des différents virus (Caballero *et al.*, 2001 ; Lopez-Ferber & Devauchelle, 2005). Ces nucléocapsides sont entourées par une enveloppe ; l'ensemble nucléocapside plus enveloppe constituant les virions. Les baculovirus produisent deux types de virions durant leur cycle d'infection, différents en structure et fonction : les ODV (Occlusion Derived Virus, [Figure 1.7](#)) et les BV (virus bourgeonnants ou Budded virus, [Figure 1.8](#)). Les ODV sont libérés lors de la dissolution des corps d'inclusion (Occlusion Body, OB) et sont responsables de l'infection des cellules épithéliales de l'insecte. Les BV, quant à eux, sont une forme bourgeonnante du virus et vont être impliqués dans l'infection de cellule à cellule, ils sont responsables de l'infection systémique.

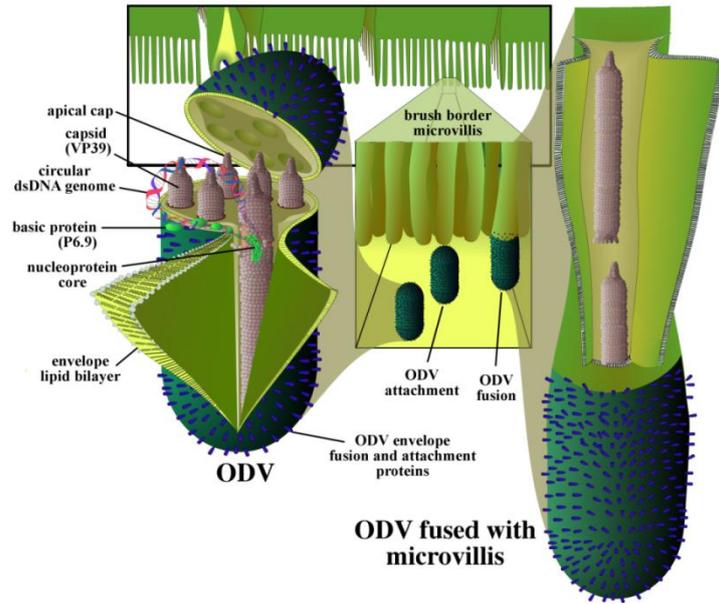


Figure 1.7. Représentation de la forme incluse du baculovirus (ODV) (Slack & Arif, 2007).

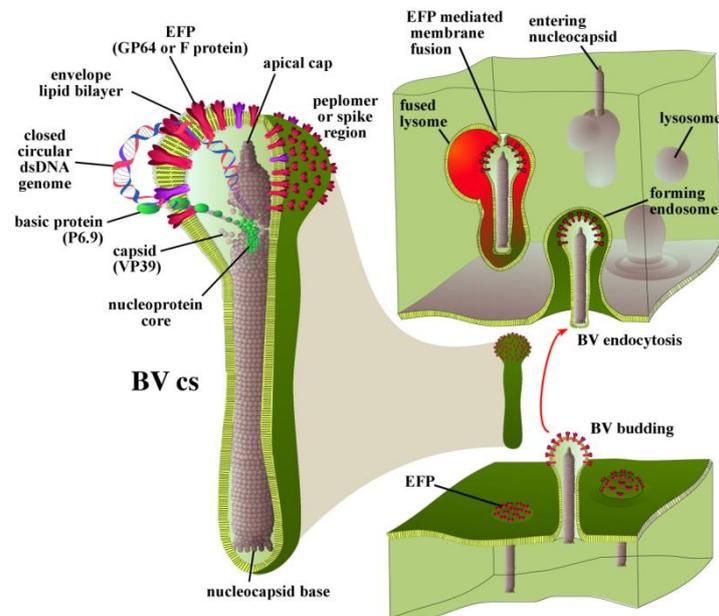


Figure 1.8. Représentation la forme bourgeonnante d'un baculovirus (Slack & Arif, 2007).

Ces deux formes sont similaires du point de vue génétique : elles contiennent le même génome, mais varient par l'origine et la composition de leur membrane et la présence ou non d'un corps d'inclusion. Les OB sont produits dans le noyau de la cellule et constitués d'une matrice protéique dont le composant majoritaire est la granuline pour les GVs et la polyédrine chez les NPVs. D'autres protéines codées par des gènes viraux ou cellulaires peuvent être

contenues dans les OB allant des protéines PIF (« per os infectivity factor ») responsables de l'entrée dans les cellules intestinales à diverses particules virales (Braunagel *et al.*, 1996 ; Faulkner *et al.*, 1997 ; Kikhno *et al.*, 2002).

Pour la formation des OB, les nucléocapsides, assemblées dans le noyau, vont s'entourer d'une membrane assemblée dans le noyau de la cellule, puis d'une matrice protéique pour constituer les OB (Occlusion Body). C'est cette forme qui va permettre au virus de survivre dans la nature. L'OB peut contenir plusieurs virions ou seulement un (polyèdre ou granule, respectivement). C'est principalement la structure de ces corps d'inclusion qui a traditionnellement permis de classer les baculovirus en deux catégories distinctes, sans valeur taxinomique actuellement. Le groupe NPV où les virus produisent des corps d'inclusion de type polyèdre (0.15 à 15 µm) contenant plusieurs virions ; chacun de ces virions peut contenir une ou plusieurs nucléocapsides (Figure 1.9). Cette caractéristique permet de les diviser en deux sous-groupes: Les Single NPV (SNPV : Single Nuclear Polyhedrosis Virus) n'ayant qu'une seule nucléocapside par ODV comme *Heliothis armigera single nucleopolyhedrovirus* (HearSNPV) ou les multiples NPV (MNPV : Multiple Nuclear Polyhedrose virus) contenant deux, ou plus, nucléocapsides par ODV comme *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV (Figure 1.9).

Les OB des granulovirus (ou virus de la granulose) sont de forme ovoïde et ont une taille moyenne de 450 par 250 nm. Chez les GV, il n'y a qu'un seul ODV dans le corps d'inclusion, appelé granule et contenant, en général, une seule nucléocapside (Figure 1.9). Il existe de rares cas où quelques granules contiennent plus d'un virion (Sciocco-Cap *et al.*, 2001).

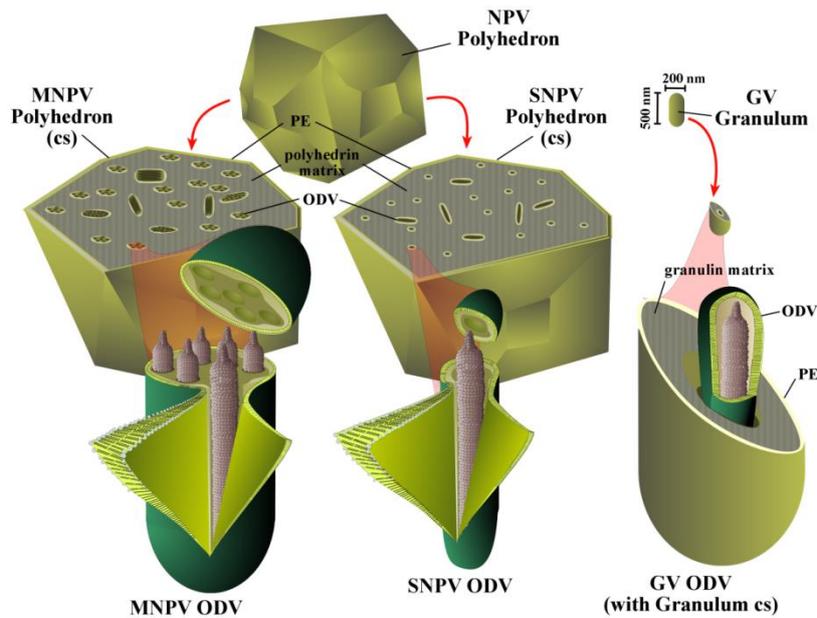


Figure 1.9. Représentation des différents types de baculovirus : MNPV, SNPV et GV (Slack & Arif, 2007).

La forme BV est produite par le bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée qui confère au virus une enveloppe d'origine cellulaire dans laquelle une ou plusieurs glycoprotéines virales sont insérées (Figure 1.10). Les BV infectent la cellule par fusion de membranes à l'intérieur des vacuoles. Le virion est internalisé dans une vacuole digestive et la fusion à pH acide est médiée par des protéines virales spécifiques. Pour les alphabaculovirus du groupe I, c'est la GP64 qui est insérée (Blissard & Wenz, 1992 ; Garry & Garry, 2008 ; Monsma *et al.*, 1996 ; Oomens & Blissard, 1999). Pour les autres baculovirus, la fusion de la membrane est due à la protéine F (Ijkel *et al.*, 2000 ; Pearson *et al.*, 2000). Cette protéine peut aussi aider à l'infection des baculovirus du groupe I dépourvus de GP64 mais la GP64 n'est pas suffisante pour aider les baculovirus du groupe II dépourvus de protéine F active (Westenberg & Vlask, 2008, Lung *et al.*, 2002 ; Long *et al.*, 2006).

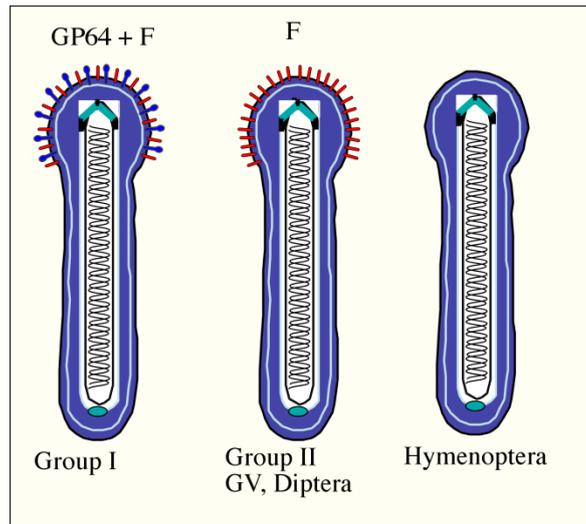


Figure 1.10. Distribution des protéines d’enveloppe de fusion. Le Groupe I possède des homologues de la GP64 et de la protéine F mais cette dernière n’est pas une protéine de fusion. Le Groupe II comprend des GVs et des virus de diptères qui possèdent seulement des homologues de la protéine F, alors que les virus d’hyménoptères ne possèdent ni homologue de la GP64, ni homologue de la protéine F (Rohrman, 2013).

L’enveloppe de la forme bourgeonnante des GVs est composée majoritairement de la protéine F comme pour les NPV du groupe II (Rohrman & Karplus, 2001). En fonction de leur tropisme tissulaire, trois types de GV ont été décrits (Hilton, 2008) : le premier type est composé de virus agissant lentement en infectant seulement les corps gras et ne concerne que les lépidoptères de la famille des *Noctuidae* ; l’hôte meurt après 10 à 35 jours. Le second type est composé de virus agissant rapidement en produisant une infection généralisée (corps gras, trachée, hémocytes...) et tuant l’hôte en seulement 5 à 10 jours ; ce type de GV infecte plusieurs familles de lépidoptères (*Tortricidae*, *Pieridae*, *Yponomeutidae*, *Pyralidae* et *Gelechiidae*). Le troisième type est, quant à lui, composé d’une seule espèce, le *Harrisinia brillians* GV (HabrGV). Ce virus se réplique uniquement dans les cellules intestinales des larves de *H. brillians*, de la famille des *Zygaenidae*.

Le nudibaculovirus, dépourvu de corps d’inclusion, a longtemps été considéré comme un sous-groupe de baculovirus mais n’est plus classé dans cette famille (Fauquet *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 1995). Ce virus possédait aussi un ADN circulaire mais ne formait pas d’OB (Wang *et al.*, 2007).

Le bracovirus a longtemps été considéré comme un baculovirus atypique, à cause de similarités de morphologie et de certains de ses gènes. Ces observations ont conduit à une hypothèse d'origines communes (Fauquet *et al.*, 2005, Murphy *et al.*, 1995).

3.2.2. Le cycle d'infection

Comme indiqué précédemment, les deux types de virions (ODV et BV) interviennent à des stades différents de l'infection. Il existe donc deux niveaux d'infection : primaire et secondaire (Figure 1.11). Chaque cellule infectée (à l'exception peut-être des cellules intestinales chez certains insectes), produit les deux types de virions de façon séquentielle.

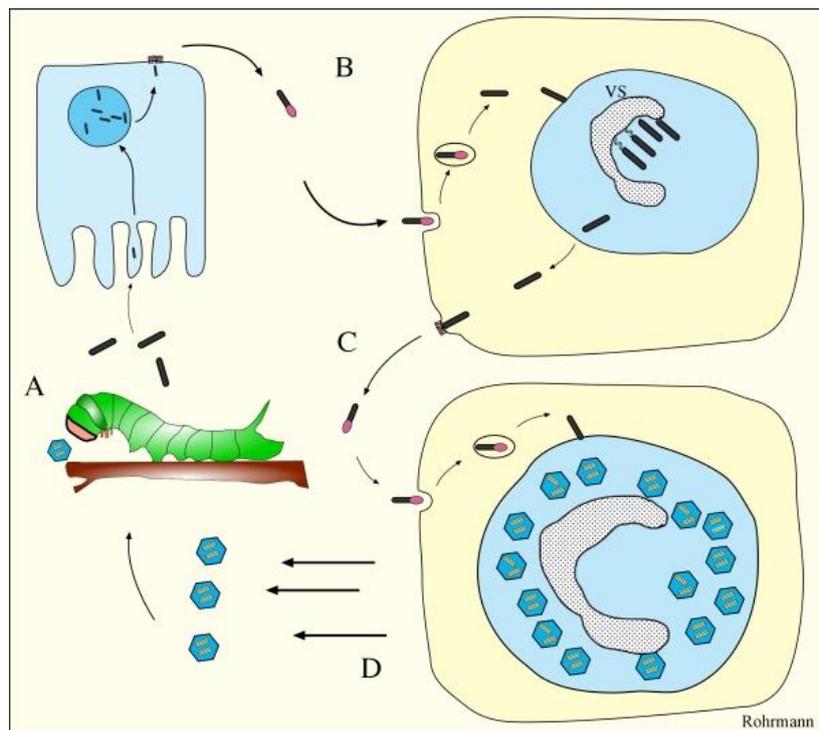


Figure 1.11. Cycle de réplication du baculovirus. Les corps d'inclusion sont ingérés par l'insecte, dissous dans l'intestin et les ODVs sont libérés infectant les cellules épithéliales (A). Le virion bourgeonne hors de la cellule en direction basale et initie une infection systémique (B). Très tôt dans l'infection systémique, plus de BVs sont produits répandant l'infection dans tout l'insecte (C). Plus tard dans l'infection, Les ODVs sont produits, et la cellule meurt en libérant les corps d'inclusion (D). Le stroma virogène (VS) est indiqué. (Rohrmann, 2013).

3.2.2.1. *L'infection primaire*

L'infection primaire démarre lorsque la larve ingère les OB. Ils sont alors dissous grâce aux conditions de pH alcalin de l'intestin de la larve, libérant les ODV (virions) et les protéines constituant les OB (Sciocco de Cap, 2001). La première barrière séparant les ODV des cellules épithéliales est la membrane péritrophique (MP). Celle-ci est composée de fibres de chitine et de glycoprotéines constituant à la fois une protection contre l'abrasion due aux particules ingérées et une barrière contre le passage d'agents pathogènes (Hegedus *et al.*, 2009 ; Terra, 2001). Les mécanismes de franchissement de cette barrière sont peu connus mais l'enhancine virale (une enzyme codée par le virus permettant la dégradation de la mucine présente dans la MP) et des protéinases d'origine cellulaire encapsulées dans les OB sont impliquées (Li *et al.*, 2003 ; Wang & Granados, 2001, Washburn *et al.*, 1995) et permettent le franchissement de la MP et la fusion des ODV avec les microvillosités des cellules épithéliales (Gutierrez & Lopez-Ferber, 2004). Les protéines PIF, évoquées plus tôt, sont essentielles à l'infection par voie orale. Les protéines PIF connues jusqu'à présent sont la P74 (PIF-0), PIF-1, PIF-2, PIF-3, PIF-4, PIF-5 (Odv-e66) et PIF 6 (SF58) (Simon *et al.* 2012) (Figure 1.12). Les quatre premières sont localisées dans l'enveloppe des ODV (Kikhno *et al.*, 2002 ; Van Oers & Vlak 2007). Certaines protéines PIF s'associent physiquement dans la membrane de l'ODV, d'autres agissant comme facilitateurs, (Peng *et al.*, 2010 ; Peng *et al.* 2012). Ces complexes jouent un rôle essentiel dans les premières étapes d'entrée des ODV mais d'autres protéines sont aussi impliquées (Rohrman, 2013). Une fois entrée dans la cellule par fusion avec la membrane cellulaire des microvillosités, la nucléocapside se déplace très rapidement en utilisant les câbles d'actine, grâce à l'action de deux protéines de la nucléocapside, P39 et P78/83, fixant l'actine par activation du complexe Arp2/3 (Charlton & Volkman 1993 ; Okawa *et al.* 2010). Cette structure facilite le transport des nucléocapsides vers le noyau (Lanier *et al.*, 1996). À l'arrivée au pore nucléaire, l'ADN viral est libéré et le cycle de réplication du virus commence.

3.2.2.2. *L'infection systémique (ou secondaire)*

Les BV produits dans les cellules intestinales lors de l'infection primaire vont initier l'infection secondaire. Comme indiqué précédemment, la GP64 ou une protéine F active,

dépendant du type du virus (I ou II), est requise dans l'enveloppe des BV pour l'entrée dans les autres cellules (Figure 1.10). La propagation du virus hors de l'intestin est impossible par passage de la lame basale, composée de fibres de chitines et ayant des pores trop petits pour le passage des BV, mais le passage par le système trachéen est possible (Engelhard *et al.*, 1994). De nombreux tissus peuvent être infectés comme les hémocytes, l'hypoderme mais les plus touchés sont les corps gras de la larve.

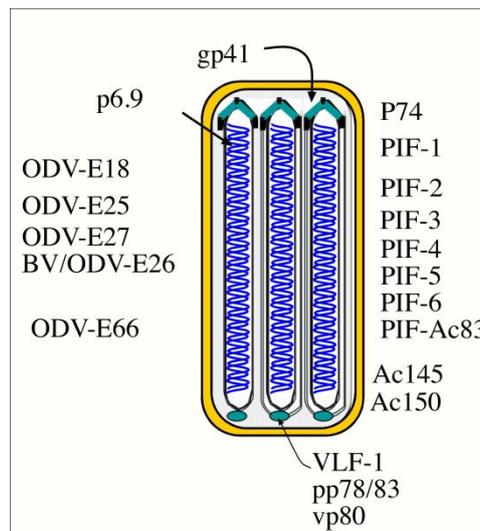


Figure 1.12. Représentation de certaines protéines structurales des ODV. Sont représentées: les protéines associées à l'enveloppe (ODV-E), les protéines PIF (également associées à l'enveloppe), la protéine de tégument, gp41, la protéine d'emballage de l'ADN, p6.9, et deux protéines basales, PP78 / 83 et VLF-1. Pour plus de commodité, VLF-1 et VP80 sont indiqués à l'extrémité basale, elles pourraient cependant être situées à l'extrémité apicale. Il existe une variété d'autres protéines de la capsid, mais elles semblent avoir une distribution plus généralisée. (Rohrman, 2013).

3.2.2.3. Le cycle de réplication dans la cellule

L'expression des gènes est structurée en quatre phases (Durantel *et al.*, 1998) :

Une phase très précoce (0 à 15 min post-infection) lors de laquelle il y a expression des gènes de régulation ne nécessitant pas d'activateurs d'origine virale pour leur transcription. Ils possèdent des promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II cellulaire. Leur rôle est de dévier la reconnaissance de la machine de transcription cellulaire des promoteurs cellulaires vers les promoteurs viraux.

Une phase précoce (15 min à 8 heures post-infection) lors de laquelle les gènes impliqués dans la réplication du virus et dans la manipulation de l'hôte sont exprimés (EFP, GP64, protéine F, inhibiteurs d'apoptose...). Ces gènes nécessitent la présence de trans-régulateurs viraux (par exemple, *ie-0*, *ie-1*, *pe38*) pour une transcription efficace. C'est à la fin de cette phase qu'a lieu la réplication du génome viral.

Une phase tardive suit (8 à 20 heures post-infection) où il y a arrêt complet de réplication d'ADN de la cellule hôte. C'est pendant cette phase que les nucléocapsides produites migrent vers la membrane cellulaire et bourgeonnent, et que les BV disséminent le virus dans l'hôte.

Une phase très tardive (20 heures post-infection) intervient à un stade avancé de l'infection. C'est ici que les nucléocapsides restent dans le noyau de la cellule et sont incluses dans le cristal protéique (polyhédrique ou granuline). Les protéases virales liquéfient l'hôte et dégradent la chitine de l'exosquelette. La descendance virale occluse est alors disséminée dans l'environnement.

Des BV sont produits de façon séquentielle, infectant les autres cellules. Chez AcMNPV, il a été montré que 20 heures après l'infection des cellules, le stroma virogène se condensait et que l'infection s'orientait vers une production d'ODV plutôt que de BV (Slack & Arif, 2007). Les nucléocapsides destinées à former des OB ne sont pas exportées en dehors du noyau. Les virions vont acquérir leur enveloppe protéique (polyhédrique ou granuline) et vont être recouverts d'une enveloppe protectrice. Les premiers corps d'inclusion complètement formés apparaissent 24 heures post-infection (Slack & Arif, 2007). Les OB ne sont pas infectieux pour les cellules de la larve, ils ne sont libérés qu'en fin de cycle lors de la lyse cellulaire. Celle-ci entraîne une liquéfaction des tissus. Elle est induite par des protéases virales comme les chitinases et les cathepsines (Hawtin et al., 1997) dégradant l'exosquelette de la larve (Asser-Kaiser *et al.*, 2010) permettant la libération des OB et ainsi leur dispersion dans l'environnement.

Ces mécanismes sont communs à tous les baculovirus, mais il existe quelques différences dans les processus d'infection entre NPV et GV. Par exemple, lors d'une infection par un NPV, le stroma virogène se trouve au centre du noyau alors que lors d'une infection par un GV, le noyau s'éclaircit et le matériel dense se concentre à la périphérie du noyau (Rohrmann, 2013). La membrane nucléaire se désintègrera alors, conduisant à la fusion entre le

nucléoplasme et le cytoplasme. La réplication continue dans la cellule et les GV se forment (Winstanley & Crook, 1993).

Chez les MNPV, une partie des nucléocapsides issues de l'infection par un virion multiple est capable de transiter à travers la cellule intestinale pour bourgeonner à la base de la cellule vers les cellules voisines, grâce à des éléments tels que la protéine GP64 produits par les nucléocapsides ayant commencé leur cycle de réplication dans le noyau (Granados & Lawler, 1981; Washburn *et al.*, 1999). Ce phénomène n'est pas observé chez les GV, ni chez les SNPV.

Comme indiqué précédemment, la voie majeure d'infection pour les baculovirus est l'ingestion d'OB. Il existe cependant quelques baculovirus chez lesquels une infection verticale a été observée mais son importance dans le maintien de la population virale est encore très peu étudiée (Virto *et al.*, 2013).

3.2.3. Les gènes viraux

Les baculovirus sont des virus à ADN circulaire double brin. La taille de leur génome est comprise entre 80 et 220 kb, celui du CpGV étant de 123,5 kb (Luque *et al.*, 2001). Aujourd'hui, plus de 60 génomes de baculovirus ont été séquencés. Ces études ont permis d'identifier de nombreux gènes viraux et de les classer en plusieurs types relatifs à leur fonction.

Ces gènes peuvent être classés en trois catégories. Les gènes structuraux codent, comme leur nom l'indique, pour des protéines de structure. Parmi eux, on retrouve *polh* qui code pour la granuline/polyhédrine protégeant les virions dans l'environnement (Croizier *et al.*, 1994), les gènes *F* et *gp64*, présents chez les BV et permettant l'entrée dans la cellule par fusion d'enveloppe (Hefferon *et al.*, 1999; IJkel *et al.*, 2000; Westenberg *et al.*, 2007), les gènes codant pour les protéines qui composent la nucléocapside, comme *p6.9* ou *vp39*, ou encore ceux codant pour les protéines PIF, présentes chez tous les baculovirus (Wang *et al.*, 2007) et essentielles pour l'infection par voie orale (Kikhno *et al.*, 2002).

La seconde catégorie concerne les gènes de contrôle du cycle viral permettant au virus de se répliquer dans l'insecte hôte. Il y a, parmi elle, la DNA polymérase ainsi que les ligases et

hélicases impliquées dans toutes les modifications de l'ADN (réparation, réplication transcription...), les transactivateurs tels les gènes *immediate early* (*ie*) ou *pe38* permettant une régulation d'activité des autres gènes pouvant parfois être impliqués dans des mécanismes d'apoptose (Prikhod'ko & Miller, 1996; 1999). Cette catégorie contient également les gènes d'expression tardifs tels que les protéines IEF, P35, P47 et 39K qui peuvent aussi intervenir dans la répression de l'activité de la cellule infectée (Rapp *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 1995).

La dernière catégorie concerne les gènes permettant au virus de contrôler la réaction de défense de l'hôte. Ce sont souvent des inhibiteurs d'hormones tels que la protéine EGT qui bloque la mue de l'hôte par catalyse de l'hormone de mue avec l'UDP-glucose (O'Reilly & Miller, 1989; 1990) ou les gènes *iap*, *p35* et *p49* dont les produits bloquent l'apoptose de l'hôte (Clem & Miller, 1994) en intervenant à divers niveaux de la cascade d'activation des capsases (Lannan *et al.*, 2007) ou encore les ubiquitines qui empêchent la dégradation de certaines protéines (Haas *et al.*, 1996). Les cathépsines et chitinases sont aussi retrouvées dans cette catégorie et permettent la liquéfaction des tissus larvaires mais aussi de la membrane péritrophique (Kang *et al.*, 1998).

Pour plus de détails sur la totalité des gènes viraux, se référer à Rohrman (2013).

Plus de 800 gènes orthologues ont été identifiés entre 29 génomes de baculovirus mais seulement quelques-uns sont communs, Ainsi, il existe 37 gènes conservés chez tous les baculovirus (« Core gene ») (Van Oers & Vlak, 2007; Harrison, 2009; Garavaglia *et al.*, 2012). Le CuniNPV ne possède que 30 gènes communs avec les baculovirus spécifiques de lépidoptères et 43 gènes sont communs entre les baculovirus d'hyménoptères et ceux de lépidoptères (Jehle *et al.*, 2006). Tous les baculovirus de lépidoptères possèdent 62 gènes en commun (Herniou *et al.*, 2003 ; Jehle *et al.*, 2006). Chez les GV, 28 autres gènes sont communs et 22 de ces gènes sont inexistantes chez les NPV, cela pouvant expliquer les différences entre ces deux groupes. Vingt gènes sont cependant présents chez certains GV et NPV mais semblent n'apporter qu'un avantage sélectif, ceux-ci n'étant pas impliqués dans le cycle viral (Hilton 2008). De nombreux gènes codent pour des fonctions encore inconnues à ce jour.

3.2.4. Coévolution et stratégies adaptatives des baculovirus

La théorie de coévolution (ou paradoxe de la reine rouge) désigne une évolution obligatoire et permanente d'une espèce pour être capable de conserver ses aptitudes, suite aux évolutions des espèces avec lesquelles elle coévolue (Van Valen, 1973). Cette théorie privilégie les facteurs biotiques comme acteurs de la sélection. Dans le cas de coévolution entre un hôte et son/ses parasite(s), des décalages évolutifs peuvent se produire, car les armes des hôtes et celles des parasites sont différentes. Ce dernier aura par exemple un temps de génération plus court et donc un taux de mutation beaucoup plus rapide que son hôte (Combes, 2003). Dans la plupart des systèmes, il est quasiment impossible pour un des partenaires d'obtenir l'adaptation idéale ; la présence de ressources étant limitée, les organismes doivent faire des concessions et ne peuvent prendre complètement l'avantage. Quelques exemples existent tout de même comme l'interaction *Asobara tabida* - *Wolbachia* où la coévolution a tourné à l'avantage du parasite qui s'est rendu complètement obligatoire à l'ovogénèse de l'insecte (Dedeine *et al.*, 2005).

Concernant les baculovirus, comme de nombreux parasites, l'atout majeur pour leur adaptabilité est leur forte plasticité génomique, due au nombre élevé de répliquions pour chaque cycle d'infection. Un seul génome qui infecte une larve peut générer plus de 10^{10} génomes. Cela permet au virus, avec les processus de mutation et de recombinaison, de s'adapter rapidement à de nouveaux environnements. En étudiant la phylogénie des baculovirus, Herniou *et al.* (2004) ont mis en évidence une spécialisation des lignées virales à un ou plusieurs ordres d'insectes, indiquant d'ancestrales coévolutions entre les virus et leurs hôtes.

La plasticité des baculovirus autorise aussi la récupération de gènes provenant de leurs hôtes, ou d'autres parasites qui se retrouveraient dans la même cellule. Des gènes influençant la physiologie des hôtes pour la moduler à leur avantage se trouvent fréquemment chez certains baculovirus, comme le gène *egt* qui, en réduisant le niveau d'hormone de la mue, permet au virus de bloquer la mue de la larve infectée (O'reilly & Miller, 1990) ou le blocage de l'apoptose avec la protéine P35 chez AcMNPV (Clem *et al.*, 1991 ; Kamita *et al.*, 1993) et la protéine IAP (inhibitor of apoptosis).

Des variations ont été observées au sein de virus appartenant au même isolat viral (diversité intraspécifique). Des études ont montré des différences génotypiques entre populations au sein de la même espèce virale provenant de zones géographiques différentes (Cory & Myers,

2003, Erlandson, 2009 ; Muñoz & Caballero, 2001). Plus intéressant encore, ces différences peuvent se refléter phénotypiquement. Ainsi, différents variants génotypiques peuvent avoir des activités biologiques différentes (Barrera *et al.*, 2013 ; Hodgson *et al.*, 2001, Simon *et al.*, 2005 ; Bernal *et al.*, 2013). Ces différences peuvent s'observer entre des isolats provenant de zones géographiques différentes, et faire qu'un isolat sera plus efficace contre un hôte provenant de la même zone que lui qu'un isolat provenant d'une zone différente. Par exemple, un isolat naturel de SfMNPV récolté en Colombie a montré une meilleure efficacité contre des larves de *S. frugiperda* provenant elles aussi de Colombie que contre des insectes provenant du Honduras (Barrera *et al.*, 2013, Escribano *et al.*, 1999). Les populations virales s'adaptent aux hôtes locaux, renforçant ainsi leur fitness.

Cette diversité observée chez les baculovirus ne serait pas possible sans une forte diversité chez leurs hôtes, jouant un rôle clef dans la sélection de génotypes viraux, comme la différence de niveaux de résistance au CpGV observée dans les populations européennes de carposapse (Schmitt *et al.*, 2013) permettant un maintien des différentes populations virales. C'est donc cette relation hôte-parasite qui permet un maintien de la diversité du virus et des hôtes.

Cette diversité au sein de mêmes isolats est un atout majeur pour ces virus et un point clef à étudier pour assurer une lutte biologique durable à base de baculovirus.

3.2.5. Le virus de la granulose de Cydia pomonella

Les nombreux développements de résistance du carposapse aux insecticides chimiques ont conduit à une plus forte utilisation des insecticides biologiques contre ce ravageur et plus particulièrement le virus de la granulose (CpGV). Une larve infectée par ce virus est présentée en [figure 1.13](#).

Le premier isolat de ce virus a été découvert au Mexique dans des vergers de pommes et de poires par Tanada en 1963 (Tanada, 1964). Ce virus a été produit en masse et testé en champs en Californie de 1965 à 1972 et à partir de 1970 en Europe (Lacey & Thomson, 2004). L'isolat a été transféré dans de nombreux centres de recherche dont l'INRA en France ([Figure 1.14](#)).

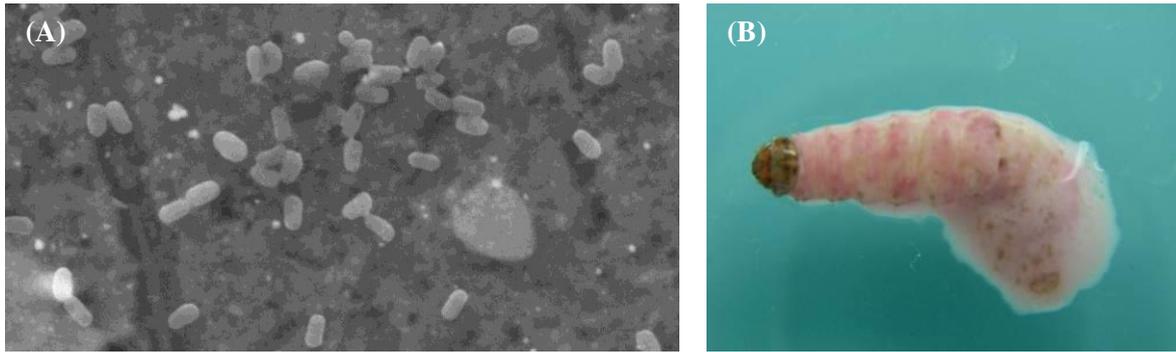


Figure 1.13. (A) *Cydia pomonella* granulovirus observés au microscope électronique. Photo : Jean-Marie Tolmès, École des Mines d'Alès. (B) Larve de *Cydia pomonella* infectée par le virus de la granulose, CpGV. Photo : Benoît Graillot, École des mines d'Alès.

La première formulation commerciale de CpGV a été développée au début des années 80 par Sandoz Corporation. De nos jours, cinq formulations commerciales de CpGV sont produites dans le monde. Seules trois de ces formulations sont homologuées en Europe (Tableau 1.3).

Les isolats viraux composants les trois formulations commerciales homologuées en Europe (Carpovirusine™, Granupom® et Madex®) proviennent tous de l'isolat mexicain (CpGV-M). Le Virosoft® homologué au Canada et aux États-Unis est composé d'un isolat québécois. D'autres isolats ont été découverts dans diverses parties du monde (CpGV-E en Angleterre, CpGV-R en Russie et CpGV-I en Iran) (Crook *et al.*, 1985 ; Rezapanah *et al.*, 2002) mais ne sont pas homologués en Europe.

Le CpGV est très virulent et le résultat de l'infection est la rupture des téguments en fin de cycle viral. (Lacey *et al.*, 2008). La dose létale pour 50% des individus traités (DL₅₀) a été estimée à moins de cinq granules par larve néonate (Harvey & Volkman, 1983; Sheppard & Stairs, 1977), provoquant la mort dans les trois jours suivant sa contamination (Brain & Glen, 1989). C'est le bio-insecticide le plus puissant contre *Cydia pomonella* et il est aussi performant que les insecticides chimiques (Baudry *et al.*, 1996). De plus, il a été prouvé qu'il était capable de contrôler les populations résistantes aux insecticides chimiques (Baudry *et al.*, 1996). Le CpGV est spécifique à *Cydia pomonella* mais il est tout de même capable d'infecter différentes autres espèces de Tortricidae comme *Cydia molesta* (la tordeuse orientale du pêcher (TO ou ofm), *Cydia nigricana* (la tordeuse du pois), ou *Thaumatotibia* (*Cryptophlebia*) *leucotreta* (faux carpocapse). La dose requise pour tuer ces insectes est, par

contre, significativement plus importante que pour *C. pomonella*, de l'ordre de 12 fois et jusqu'à 10 000 fois plus (Lacey *et al.*, 2008).

En 2003, le CpGV était utilisé sur une surface d'environ 100 000 hectares en Europe et son utilisation en vergers biologiques ne représentait, en fait, qu'environ 20% des ventes, celui-ci étant plus largement utilisé en agriculture conventionnelle pour pallier aux problèmes de résistances (Berling *et al.*, 2009).

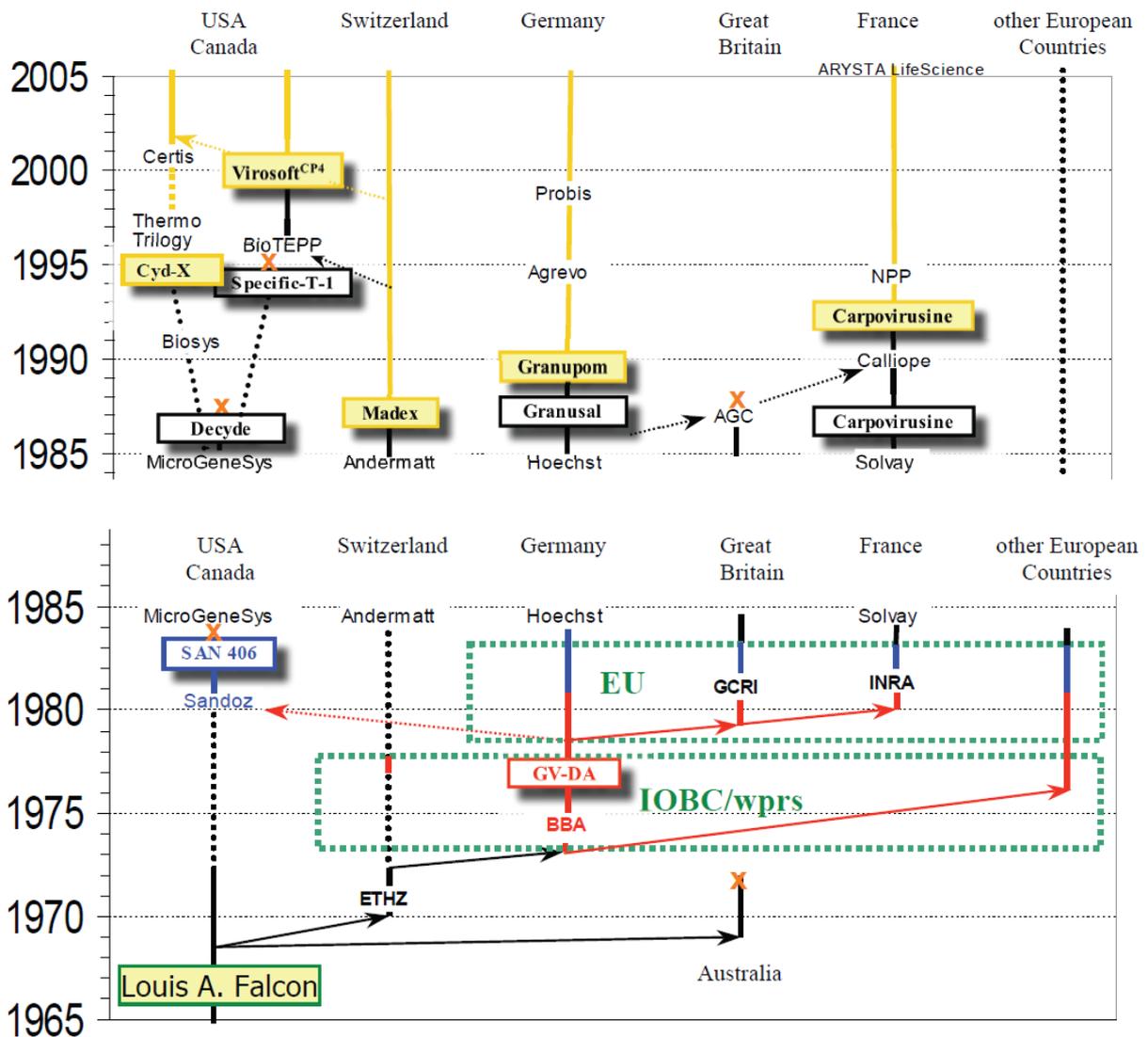


Figure 1.14. Transferts des isolats de CpGV entre les différents instituts de recherche et firmes phytosanitaires (Hüber, 2007).

Depuis 2003, des échecs de contrôle du carpocapse du pommier avec l'isolat CpGV-M, d'abord en Allemagne (Fritsch *et al.*, 2005), puis dans d'autres pays d'Europe (Sauphanor *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 2013) sont apparus. La résistance des populations en champs a été multipliée par 1000, mais ce ratio est de plus de 60 000 sur des colonies de génotype restrictif pures, par exemple *C. pomonella* R_{GV} (Berling *et al.*, 2009) ou CpRR1 (Asser-Kaiser *et al.*, 2010).

Asser-Kaiser *et al.* (2011) ont montré que la résistance du carpocapse au CpGV-M n'était pas conférée par un blocage au niveau du tube digestif ni par une modification de la MP ou par modification des récepteurs des cellules des microvillosités intestinales. La résistance est généralisée à toutes les cellules de l'insecte, le virus est capable d'infecter les cellules, mais sa réplication est bloquée à une phase précoce (Asser-Kaiser *et al.*, 2011). Fait intéressant, cette résistance est restreinte spécifiquement au génotype CpGV-M ; les autres isolats, comme CpGV-I12 (Eberle *et al.*, 2008) ou CpGV-R5 (Berling *et al.*, 2009) ne sont pas inhibés. Le mécanisme sous-jacent à cette résistance n'est pas connu. Par contre, il a été démontré (Gebhardt *et al.*, 2014) que des changements au niveau du gène viral *pe-38*, sont nécessaires et suffisants pour expliquer la capacité à se répliquer ou pas dans un hôte restrictif.

3.2.6. Relations baculovirus/hôte : développement de résistances

La sensibilité des larves d'insectes aux baculovirus qui leur sont inféodés varie à trois niveaux : en fonction du stade de développement de la larve, entre populations d'insectes et, finalement, d'une larve à l'autre.

La résistance aux baculovirus augmente avec l'âge des larves. Cette variation n'est pas du même niveau entre espèces. Briese (1986) a résumé la variation pour 20 espèces d'insectes. Il a montré que le ratio de résistance augmentait de 350 000 fois pour un isolat de *Pieris brassicae* granulovirus, mais seulement de 10 fois pour un isolat de *Cydia pomonella* granulovirus, sur leurs hôtes respectifs. La plus grande susceptibilité est toujours observée sur les stades larvaires précoces, justifiant l'importance d'un traitement très tôt en cas d'utilisation de baculovirus pour le contrôle de ravageurs. Il a été proposé que cette résistance puisse n'être qu'un reflet du poids de l'hôte mais aucune augmentation de la dose n'est requise en cas d'injection du virus (Engelhard & Volkman, 1995). De plus, les larves sont plus sensibles lorsqu'elles sortent de mue. Dans ces conditions, leur sensibilité peut revenir

aux niveaux des larves néonates. Ces observations conduisent à considérer que cette résistance développementale est en relation avec le passage du tube digestif, avant l'infection systématisée de toutes les autres cellules. L'intestin constitue une barrière à la colonisation des larves par le virus. Des études détaillées ont révélé une augmentation de la difficulté pour le virus à transférer l'infection des cellules intestinales vers le reste de la larve. Le premier mécanisme concerne la capacité de l'hôte à renouveler ses cellules intestinales par la mue, permettant l'élimination des cellules infectées pendant le développement larvaire. Pendant la mue du quatrième vers le cinquième stade larvaire de *T. ni*, toutes les cellules intestinales infectées sont éliminées (Engelhard & Volkman, 1995). Il n'y a aucune observation indiquant la présence d'un renouvellement total des cellules intestinales à chaque phase de mue, ni dans toutes les espèces. Le second mécanisme proposé est la modification de la membrane péritrophique (MP) qui pourrait protéger de l'infection les cellules intestinales. Au cours du développement larvaire, l'épaisseur de cette membrane, voire sa structure, sont variables. Il a été montré que la présence d'azurants optiques dérivés du stilbène réduisait ou annulait cette résistance développementale (Murillo *et al.*, 2003). Les azurants optiques sont connus pour interférer avec la synthèse de la chitine en perturbant la structure de la MP, dont la chitine est un composant clé (Wang & Granados, 2000). Par ailleurs, il semble que les agents azurants soient capables de prévenir le renouvellement des cellules intestinales (Washburn *et al.*, 1998), ce qui conduirait à une diminution de la capacité d'élimination du virus et donc, augmenterait la susceptibilité de l'hôte.

Des variations dans la sensibilité à un isolat viral donné entre des populations d'insectes provenant de zones géographiques différentes ont aussi été observées (Briese 1986). Même au sein d'une population, la présence d'individus présentant une sensibilité plus faible a été démontrée pour le carpocapse du pommier (Sheppard & Stairs, 1977). Ces différences ont été associées au fond génétique des populations, au sein desquelles les individus ne sont pas génétiquement homogènes. Des isolats viraux provenant de localités différentes peuvent avoir des efficacités variables selon les populations d'insectes. Souvent, l'isolat local offre le contrôle optimal pour son hôte. Le maintien des différences de sensibilité entre les populations d'insectes ne semble pas être lié à la présence de virus. David & Gardiner (1960) ont montré que les colonies de *Pieris brassicae* montraient des différences de sensibilité à deux isolats du *Pieris brassicae* granulovirus (PbGV) et que cette différence était maintenue en laboratoire pendant 36 générations en absence de contact avec le virus. Le contrôle de ces différences a une origine génétique variable. Chez la teigne de la pomme de terre,

Phthorimaea operculella, la réduction de sensibilité à un isolat de *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) était due à un seul gène autosomal dominant, provoquant une résistance 15 fois supérieure à celle des individus sensibles (Briese, 1982). Chez la noctuelle du maïs, *Spodoptera frugiperda*, une variation de sensibilité d'un facteur 5 de deux colonies de laboratoire à trois baculovirus différents a été attribuée à un seul ou quelques gènes autosomaux (Reichelderfer & Benton, 1974). À l'inverse, chez le carpocapse des pommes, la réduction de sensibilité semble être sous contrôle multigénique (Berling et al 2013). Finalement, il est possible d'observer des larves, totalement ou partiellement résistantes à un virus donné. En laboratoire, Abot *et al.* (1996) ont montré que des populations du ver du pois Mascate, *Anticarsia gemmatalis*, collectées au Brésil et aux États-Unis pouvaient développer une résistance lorsqu'elles sont exposées à une pression de sélection exercée par l'isolat LD-79 d'AgMNPV. La résistance commence à se développer après 4-5 générations et augmente, atteignant un plateau après 15 générations. Le niveau de résistance final (atteignant une augmentation de 17 000 fois) dépend de la population d'origine, indiquant que la variabilité génétique d'origine de la population hôte est un facteur important. Cependant, en champ au Brésil, où l'utilisation d'AgMNPV pour contrôler *Anticarsia gemmatalis* couvre environ un million d'hectares, aucune augmentation de la dose requise pour contrôler le ravageur n'a été observée. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'isolats multiples et variables d'une année sur l'autre ; isolats qui sont produits en champ, sur les mêmes populations à traiter.

Les mécanismes impliqués dans la résistance sont variables d'un cas à l'autre. Fuxa & Richter (1990) ont montré que la mortalité des larves sensibles et résistantes de *Spodoptera frugiperda* ne différait pas si le virus était injecté dans l'hémocèle et ont conclu que la résistance était associée à l'intestin, de façon similaire à celle décrite entre larves d'âges différents. L'analyse de la structure de la MP, a montré des différences entre des colonies de laboratoire de *A. gemmatalis* résistantes et sensibles au AgMNPV, suggérant son implication dans la résistance (Levy *et al.*, 2007). Grove & Hoover (2007) ont observé une variation dans la sensibilité de larves de *Limantria dispar* de même stade, pas seulement limitée à l'intestin, mais aussi systémique. Les auteurs concluent à une défense antivirale hormonale contrôlée.

4. Objectifs de la thèse

La mise au point d'isolats capables de contrôler la résistance du carpocapse des pommes en vergers n'était qu'une première réponse au problème soulevé par l'apparition de résistances au champ. Restait à explorer la durabilité, c'est-à-dire, l'efficacité dans le temps et l'espace des approches et des outils dont nous disposons pour la protection des cultures. Cette thèse s'est effectuée en partenariat avec la société Natural Plant Protection, l'École des Mines d'Alès et l'INRA d'Avignon. Elle s'inscrit dans le projet Européen PURE, visant à développer des systèmes intégrés de protection des cultures et à analyser la durabilité des systèmes de protection des cultures.

La thèse se scinde en 4 parties : une première partie sur l'étude de l'hôte et de la variation de sensibilité de plusieurs colonies au CpGV. L'étude des variations de sensibilité de l'hôte est intéressante pour mieux cerner les mécanismes impliqués dans l'apparition des résistances.

La seconde partie va s'intéresser à l'étude de l'adaptation du virus à son hôte. Cette partie contiendra des travaux faisant directement suite aux travaux de thèse de Marie Berling sur la mise au point de l'isolat CpGV-R5 (2016-r16), contournant la résistance au CpGV-M des insectes en vergers. Une étude du coût à contourner la résistance pour le virus sera aussi détaillée. Des travaux de séquençage ont également été réalisés sur cinq isolats viraux avec analyse des gènes positivement sélectionnés dans le but d'ouvrir de nouvelles pistes sur des gènes potentiellement importants pour la fitness du virus. Pour compléter cette partie, l'adaptation d'un mélange de CpGV à la tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) sera détaillée.

La troisième partie sera consacrée à l'impact de l'augmentation de la diversité de CpGV pour le contrôle du carpocapse des pommes (*C. pomonella*). Le but est ici d'explorer les conséquences de l'augmentation de la diversité du virus sur l'efficacité et la durabilité du contrôle du ravageur.

Enfin, la quatrième partie étudiera l'évolution, au cours des générations, sur différentes colonies d'insectes, de plusieurs populations hétérogènes de granulovirus. Cette partie permettra l'analyse de l'évolution virale sous différentes pressions de sélection et pourrait permettre d'améliorer nos connaissances sur l'infection virale et d'ouvrir de nouvelles voies pour la production de bio-insecticides.

Matériel et Méthodes

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

Ce chapitre regroupe l'ensemble des souches virales utilisées, les techniques d'élevages ainsi que l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées au cours de cette thèse.

1. Les colonies d'insectes

1.1. Les colonies de carpocapse sensibles au virus (Sv et CpNPP)

La colonie sensible au virus Sv est issue d'une population de *C. pomonella* récoltée dans un verger du sud-est de la France (Les Vignières, Vaucluse). Cette colonie est élevée en laboratoire sur milieu artificiel à l'INRA d'Avignon (Guennelon, 1981) depuis 20 ans.

Une autre colonie sensible au virus a été utilisée, CpNPP. Cette dernière est utilisée à l'échelle industrielle pour la production de la Carpovirusine™ (Natural Plant Protection, Pau, France). CpNPP a été élevée en laboratoire pendant plus de 20 ans et est originaire du nord de la France.

1.2. La colonie de carpocapse de laboratoire, résistante à CpGV-M (R_{GV})

La colonie résistante au virus a été obtenue après croisement entre la colonie sensible SV et des individus provenant d'une population résistante trouvée dans la nature aux environs de St Andiol (St-A) (Sauphanor *et al.*, 2006). La résistance ayant été définie comme dominante, les individus survivants à une concentration discriminante en virus, appliquée à chaque cycle, ont servi aux croisements de la génération suivante. La colonie R_{GV} résultant de ces croisements présente un niveau de résistance supérieur à la population St-A. La totalité des individus R_{GV} composant la souche est hétérozygote pour le caractère de résistance et possède un fond génétique identique à 99,6 % à celui de la colonie Sv (Berling *et al.*, 2009). Le facteur de résistance se trouve sur le chromosome sexuel Z. Chez les lépidoptères, le déterminisme sexuel est opposé à celui des mammifères, le sexe hétérogamétique, les femelles étant WZ, et les mâles étant ZZ. Comme le caractère de résistance est dominant, il est impossible d'éliminer complètement des allèles sensibles, qui peuvent rester masqués dans des mâles

hétérozygotes. Par conséquent, cette colonie est resélectionnée tous les ans pour conserver un fort taux de résistance. La dernière sélection a été effectuée en septembre 2014.

1.3. La population mixe de carpocapse (CpLGEI)

La colonie CpLGEI est une colonie hétérogène composée de 90% de Sv et 10% de R_{GV}. Cette colonie a été créée pour simuler une population naturelle de carpocapses.

1.4. La tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) (TO)

La colonie de Tordeuse orientale, *Cydia molesta*, a été fournie par l'INRA d'Avignon. Cette colonie de laboratoire a été fondée avec des individus collectés en 2002 dans des vergers de pêches italiens (Fournis par Fabio Molinari, Université de Plaisance, Italie). Elle a été élevée en masse sur le milieu Stonefly (Heliotis Diet, WARD's Natural Science, Rochester, NY, USA) pendant 6 ans par le service de protection des cultures de Lyon (France). Elle a ensuite été transférée à l'INRA d'Avignon en 2008. Depuis, elle est maintenue en élevage continu (environ 10 générations par an) sur milieu artificiel en parallèle à l'INRA et au LGEI.

2. Les Isolats viraux

Les isolats décrits ici correspondent aux isolats de départ. L'isolat CpGV-M (notre stock # 2020-S1) est l'isolat viral utilisé comme référence. Cet isolat est génétiquement proche de l'isolat mexicain découvert et décrit par Tanada en 1964. La plupart des produits à base de CpGV commercialisés en Europe et notamment la CapovirusineTM produite par NPP, sont similaires à cet isolat mexicain.

L'isolat NPP-R1 a été fourni par NPP. Cet isolat était celui qui contournait mieux la résistance, et est donc à l'origine de l'isolat CpGV-R5. Son origine géographique n'a pas été précisée (Berling *et al.*, 2009).

L'isolat NPP-R1.8 (2016-r8) correspond à l'isolat NPP-R1 après 8 passages successifs sur larves résistantes R_{GV}.

L'isolat CpGV-R5 (2016-r16) est l'isolat viral capable de contourner la résistance de R_{GV}. Cet isolat a été mis au point par Marie Berling au cours de sa thèse à partir de l'isolat NPP-R1 (Berling, M., 2009).

L'isolat I12 (# 2012) est un isolat iranien fourni par le DLR Rheinpfalz dans le cadre du projet européen CRAFT « Sustain CpGV » dont faisait également partie NPP. Cet isolat a été

amplifié par NPP et envoyé à l'Ecole des Mines d'Alès (EMA) en décembre 2006. Il a été identifié comme efficace sur les populations résistantes en Allemagne (Eberle *et al.*, 2008).

L'isolat E2 a été fourni par le DLR Rheinpfalz dans le cadre du projet européen CRAFT « Sustain CpGV » dont faisait également partie NPP. Il a été amplifié et formulé à NPP pour les essais terrain 2008.

L'ensemble des titres des solutions virales a été déterminé par NPP par un comptage du nombre de granules viraux à l'aide d'un microscope optique à fond noir (Olympus BX41TF) ($\times 600$) et d'une chambre de comptage Petroff-Hauser d'une profondeur de 0,01 mm.

D'autres isolats ont été produits au cours du travail. Ils sont décrits dans les différentes parties de la thèse.

3. Elevages de *Cydia pomonella* et *Cydia molesta*

Les conditions standards appliquées pour les élevages de *C. pomonella*, *C. molesta*, et à l'ensemble des tests nécessitant un développement larvaire sont une température de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% ($\pm 10\%$).

3.1. Elevage de masse

Pour les croisements des colonies pures de *C. pomonella* (CpNPP, Sv, R_{GV}) les adultes sont placés dans des volières cubiques d'environ 25 cm de côté avec une feuille de Parafilm[®] en son centre servant de feuilles de ponte. Des abreuvoirs contenant de l'eau sucrée et une mèche en coton dentaire permettant la montée de la solution par capillarité sont disposés dans les volières pour l'alimentation des papillons. Les feuilles de pontes sont récoltées deux fois par semaine (lundi et vendredi) et incubées à 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% ($\pm 10\%$). Les larves néonates servent en partie au maintien des élevages, l'autre partie est dédiée aux essais biologiques.

Pour *C. molesta*, les adultes sont placés en boîte rondes aérées d'environ 600 cm³ aux parois tapissées de Parafilm[®] pour permettre la ponte des individus. Les feuilles de pontes sont récoltées deux fois par semaine (lundi et vendredi). Les conditions d'incubation et d'utilisation sont les mêmes que pour *C. pomonella*.

3.2. Elevages sans sélection au virus

Les larves de *C. pomonella* et *C. molesta* sont élevées sur un milieu artificiel contenant de la farine de maïs, du germe de blé, de la levure de bière, des conservateurs (acide ascorbique, acide benzoïque, formaldéhyde, antibiotiques, antifongiques) et de l'agar-agar (Guennelon, 1981). L'étuve d'élevage est maintenue à une température de 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% ($\pm 10\%$).

3.3. Sélection de la population R_{GV} de *C. pomonella* par survie au traitement au CpGV-M

La sélection des insectes résistants au CpGV-M est réalisée en microplaques ELISA 96 puits à fond plat (Greiner bio one). Environ 200 μL de milieu artificiel (*Heliothis* Diet, Ward's natural science, NY, USA) additionnée de 0,2 % d'acide acétique sont déposés dans chaque puits et lissés avec une tête de clou. 6 microlitres de suspension virale à la concentration de 1000 granules viraux/ μL sont appliqués à la surface du milieu (surface du puits = 28 mm^2) à l'aide d'une micropipette. Une larve néonate, âgée de moins de 12 h, est alors prélevée avec un pinceau et déposée dans chaque puits. Après avoir scellé les puits avec des bandes de parafilm[®] recouvert d'une plaque de verre pour éviter la fuite des larves, la microplaque est incubée à 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% ($\pm 10\%$) pendant 7 jours. A la lecture du test, toutes les larves survivantes sont considérées comme résistantes et mises en élevage dans un milieu classique sans sélection pour le reste du développement larvaire.

4. Essais biologiques

4.1. Tests biologiques

La sensibilité aux virus est évaluée sur des larves néonates, âgées de moins de 12 heures, en utilisant la méthode de dépôt en surface, dérivée de celle appliquée pour les tests de diagnostic de résistance de *C. pomonella* aux insecticides chimiques (Reyes & Sauphanor, 2008) (Figure 2.1). Le milieu artificiel (*Heliothis* Diet, Ward's natural science, NY, USA) a été utilisé avec ajout de 0,2 % d'acide acétique.

La détermination de la concentration discriminante utilisée pour le diagnostic des populations ainsi que les premiers essais biologiques ont été effectués avec ce milieu. Au minimum cinq concentrations, en plus du témoin traité à l'eau distillée, ont été utilisées pour établir les droites de mortalité et déterminer les concentrations en virus létale pour 50 % (CL_{50}) et 90%

(CL₉₀) des individus. Chaque test a été réalisé avec au moins 32 larves par concentration et avec au minimum 3 répétitions. Les plaques sont incubées à 25°C (± 1°C) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% (± 10%). La lecture finale du test est réalisée le septième jour à l'aide d'une pointe métallique permettant de rechercher les larves dans le milieu et l'application un stimulus mécanique en cas de doute sur la survie de la larve.

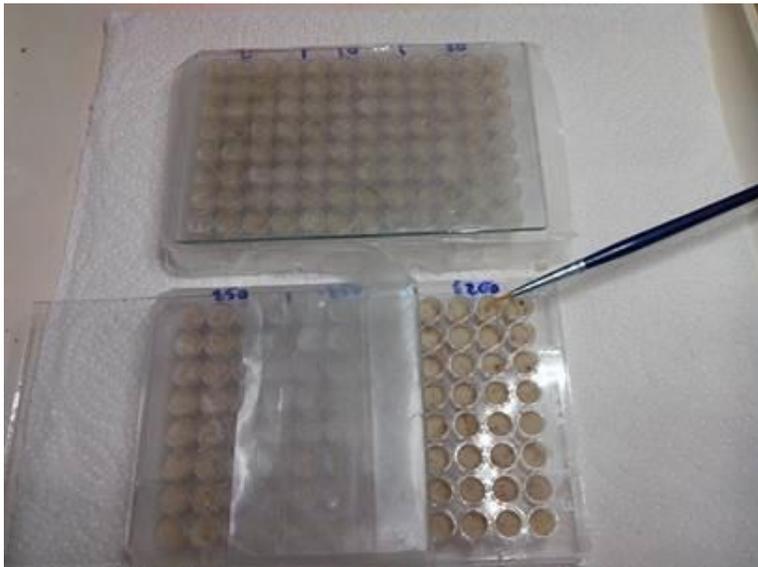


Figure 2.1. Préparation d'un test biologique sur larves néonates.

4.2. Analyse des données

Les mortalités relevées dans les essais biologiques sont analysées selon une transformation log-probit afin de déterminer la relation concentration-mortalité (Finney, 1949; 1971) à l'aide du logiciel Polo+ (LeOra Software 2012).

5. Amplification et purification du virus

5.1. Amplification sur larves

L'amplification des isolats viraux est réalisée *in vivo* par multiplication des isolats sur des larves sensibles au stade L3 ou L4 (âgées de 7 jours). Les larves sont placées dans des plaques 24-puits contenant environ 1 g de milieu artificiel sur lequel sont déposés 50 µL de suspension virale à une concentration de 1×10^4 granules viraux/µL, puis incubées à 25°C (± 1°C) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% (± 10%). Les larves

infectées sont extraites du milieu artificiel quand elles sont manifestement virosées (entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour post-inoculation). Les larves présentant des symptômes d'infection virale sont ensuite placées dans des tubes par lot de 3 et réincubées à 25°C pendant 24h de plus sans milieu nutritif, puis congelées à -20°C ou utilisées directement. La purification des corps d'inclusion viraux (OB pour Occlusion Body), communément appelés « granules » se fait en broyant les larves dans 500 µL d'eau distillée par tube puis le broyat est filtré à travers une gaze pour éliminer les débris de cuticule. Les tubes sont rincés avec 500 µL d'eau distillée supplémentaires. Le filtrat est rassemblé dans un tube Eppendorf® de 1,5 mL. Une première centrifugation de 5 minutes à 8000 g est réalisée et le surnageant éliminé. Le culot de granules est rincé avec 1 mL d'eau distillée avant d'être centrifugé une seconde fois 5 minutes à 8000 g. Après élimination du surnageant, les granules sont repris dans un volume de 1 mL pour 10 larves broyées. L'échantillon est ensuite conservé au congélateur à -20°C. Pour les amplifications de virus réalisés au laboratoire, la détermination approximative du titre est réalisée par spectrophotométrie (420 nm) d'après la formule appliquée pour le titrage d'une suspension de *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) (Zeddami *et al.*, 2003). Cette formule a été adaptée au CpGV :

$$\text{Titre viral (OB/}\mu\text{l)} = \frac{\text{DO}_{420\text{nm}} \times \text{dilution} \times 2,6 \cdot 10^9}{0,8}$$

Une dilution au 100^{ème} est nécessaire.

5.2. Passages successifs sur larves

Afin de permettre une évolution des isolats viraux d'origine et des populations virales expérimentales, des passages successifs ont été réalisés sur des larves selon le procédé décrit dans le paragraphe précédent. Chaque cycle est initié à partir de l'inoculum viral du cycle précédent. 96 larves par passage sont inoculées afin de récupérer un minimum de 30 larves virosées servant à la création de l'isolat suivant. La concentration en granules de l'isolat est estimée par spectrophotométrie avant le comptage manuel au microscope optique à fond noir (Olympus BX41TF), plus précis, effectué à NPP.

5.3. Populations expérimentales issues de mélanges de CpGV-M + CpGV-R5

Différentes populations expérimentales ont été construites en mélangeant des granules des deux isolats. Les populations ont été construites avec les proportions de chaque isolat indiquées dans la table (Tableau 2.1)

Tableau 2.1. Composition des différents mélanges viraux réalisés.

Mélanges viraux	Proportion de CpGV-M (%)	Proportion de CpGV-R5 (%)
M99-R01	99	1
M95-R05	95	5
M90-R10	90	10
M50-R50	50	50
M10-R90	10	90

Les populations expérimentales sont amplifiées sur larves sensibles, CpNPP ou sur larves résistantes, R_{GV}. Le protocole d'amplification précédent est utilisé. La production obtenue sert pour effectuer l'amplification suivante. Six générations de chaque mélange sont réalisées sur CpNPP ainsi que sur R_{GV}. Le plan de cette expérience est détaillé dans la partie 4 (Figure 6.1)

5.4. Passages successifs de CpGV-R5 sur larves sensibles CpNPP

Pour détecter une éventuelle perte d'efficacité de CpGV-R5 après production sur larves sensibles (sans pression de sélection), des passages successifs ont été réalisés. La production obtenue sert pour effectuer l'amplification suivante. Le protocole d'amplification est le même que précédemment.

5.5. Passages successifs d'une population génotypiquement hétérogène sur *C. molesta*

Afin d'adapter le CpGV à *C. molesta*, une population virale plus hétérogène du point de vue génétique a été construite. Cette population est composée d' $\frac{1}{4}$ de CpGV-M, $\frac{1}{4}$ de CpGV-R1, $\frac{1}{4}$ de CpGV-E2 et $\frac{1}{4}$ de CpGV-I12. Un premier passage de cette population est effectué sur CpNPP dans le but d'obtenir un stock viral initial présentant une forte diversité génétique. Cette amplification est réalisée comme précédemment.

Des passages successifs sur *C. molesta* sont ensuite effectués. Les larves néonates sont placées dans des plaques ELISA 96 puits préalablement remplis de milieu artificiel (Heliothis Diet, Ward's natural science NY, USA) additionné de 0,2 % d'acide acétique. Les larves sont ensuite placées à 27°C pendant 4 jours. Après ces 4 jours, les larves sont infectées avec la dernière production virale. On verse directement 12 μ L de solution virale à environ 210 000 OB/ μ L dans les puits contenant les larves. Les plaques sont ensuite placées à 25°C (\pm 1°C) avec une photopériode de 16 heures et une humidité relative de 60% (\pm 10%) pendant 5 jours. Les larves infectées sont alors récoltées, broyées et passées sur gaze. L'ensemble des titres de ces solutions virales a été déterminé par NPP par un comptage du nombre de granules viraux à l'aide d'un microscope optique (Olympus BX41TF) à fond noir (\times 600) et d'une chambre de comptage Petroff-Hauser d'une profondeur de 0,01 mm.

6. Extraction/purification ADN

Une suspension de 500 μ L de granules à 10^7 OBs/ μ L est additionnée d'un volume équivalent de 0.1 M de Na₂CO₃ afin d'obtenir la lyse des granules qui se manifeste par une clarification de la solution. Une extraction classique au phénol chloroforme est alors appliquée avec une étape phénol-chloroforme/alcool isoamylique (24 :1 (vol : vol)), deux étapes phénol seul et une dernière chloroforme seul. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol absolu froid en présence de 0,2 M de sodium acétate et conservé à -20°C sur une nuit. Les échantillons sont alors centrifugés 30 min à 10000 x g pour envoyer l'ADN au culot. Ces culots sont alors rincés délicatement à l'éthanol froid 70%, séchés plusieurs heures et remis en suspension dans du tampon TE 1X (tris-EDTA 0,1M-0,01M).

La vérification de l'intégrité de l'ADN est effectuée par migration sur gel d'agarose à 0,6% de 2 μ L d'ADN non digéré additionné de 2 μ L de bleu et 8 μ L de tampon TAE 1X par puits. Le gel est ensuite coloré 20 minutes au bromure d'éthidium (BET), rincé à l'eau distillée et

révélé aux UV. L'ADN viral intact ne rentre pas dans le gel et reste collé aux puits de charge (King et Possee, 1992).

7. Analyse de la diversité génétique par RFLP « Restriction Enzyme Length Polymorphism »

Environ 500 ng d'ADN viral purifié sont digérés avec les enzymes *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *SalI*, ou *XhoI* dans le tampon préconisé à 37°C pendant 3 h. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% dans du tampon tris-acétate-EDTA à 80V pendant environ 4h. Le marqueur utilisé comme référence est l'ADN du phage λ digéré par *HindIII*. Les fragments ont été visualisés sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium. La taille des fragments et la quantité d'ADN ont été estimées grâce au logiciel Kodak 1D image system (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

8. Séquençage et analyse basique du génome de 5 isolats viraux

8.1. Séquençage et étude des séquences

Les isolats viraux séquencés sont CpGV-M, CpGV-R5, CpGV-R1.8, CpGV-E2 et CpGV-I12.

Le séquençage a été réalisé par la plateforme de génotypage GENTYANE (INRA UMR 1095, Clermont-Ferrand, France) et par Eurofin Genomics MWG (Courtabœuf, France).

Les Contigs ont été assemblés de novo grâce au logiciel Clone Manager (Sci-Ed software, Morrisville, NC, USA).

Après séquençage, il existait quelques régions manquantes (« gaps ») dans les génomes. Des oligonucléotides ont été élaborés grâce au logiciel Clone Manager (Sci-Ed software, Morrisville, NC, USA) dans le but de combler ces « gaps ».

8.2. Extraction d'ADN par lyse des granules

Chaque suspension de granules est diluée (40 μ L dans 60 μ L d' H_2O). 100 μ L de tampon d'extraction (Na_2CO_3 0,2M, NaCl 0,34M, EDTA 0,02M pH=10,5) sont ajoutés dans le but de lyser les granules. Les tubes sont ensuite placés au bain-marie 30 minutes à 37°C. Les réactions sont ensuite neutralisées avec du HCl 1M (1/10 du volume total) et ajustées à 0,5% SDS (1/20 du volume total avec du SDS 10%). Une centrifugation finale de 1 minute à 13000 rpm est alors effectuée afin d'éliminer d'éventuels débris.

8.3. Amplification de fragments viraux par « Polymerase Chain Reaction »

Chaque extraction d'ADN viral est diluée au 1/50. Le mélange PCR est composé de 20 µL de PCR Hotmastermix 2.5X (5prime, Hilden, Allemagne), 2 µL de primer forward (10µg/µL), 2 µL de primer reverse (10µg/µL), 2 µL d'ADN viral et 24 µL d'H₂O. Après 3 minutes de pré-dénaturation à 94°C, le cycle de PCR consiste en : 15 secondes de dénaturation à 94°C, 40 secondes d'hybridation à 60°C et 1 minute et 30 secondes d'élongation à 72°C. Ce cycle est répété 35 fois.

8.4. Comparaison des séquences

Les 5 génomes ont été alignés et comparés au génome de référence CpGV-M (GenBank accession number: NC002816, Luque *et al.*, 2001) grâce au logiciel Geneious (Biomatters, Auckland, NZ). Les différences en nucléotides et acides aminés entre chacun de ces génomes ont été relevées.

8.5. Dot plots

Des graphiques en dot plots ont été créés afin de visualiser les similarités et différences entre les génomes des différents isolats viraux. Ils ont été réalisés grâce au logiciel Guepard 1.30 (Krumisiek *et al.*, 2007).

8.6. Analyse des ORF positivement sélectionnés

Une première analyse des pressions de sélection agissant sur chaque ORF a été faite en utilisant une approche par inférence bayésienne sur le serveur Selecton (<http://selecton.tau.ac.il/>) avec les paramètres par défaut (Doron-Faigenboim *et al.*, 2005; Stern *et al.*, 2007) pour calculer le ratio non-synonymes/synonymes ($\omega=d_N/d_S$) de substitution de nucléotides agissant sur chaque ORF et pour déduire des sites d'acides aminés simples soumis à ce processus. Pour les ORF apparaissant significativement sélectionnés ($p<0.05$), des analyses complémentaires sont réalisées en utilisant deux méthodes du maximum de vraisemblance ; le logiciel Paml4 (Yang, 2007) et le logiciel HyPhy (Pond *et al.*, 2005). Seuls les ORF significativement sélectionnés avec les 3 méthodes sont comptabilisés. Les autres sont considérées comme des faux positifs.

9. Analyse de la diversité génétique de marqueurs viraux par PCR

9.1. Détermination de marqueurs spécifiques pour les isolats viraux CpGV-M et CpGV-R5 pour PCR quantitative.

Pour différencier les deux isolats CpGV-M et CpGV-R5, la variabilité observée lors de l'analyse de séquences a été mise à profit pour développer trois couples d'oligonucléotides permettant de différencier les deux isolats.

Les oligonucléotides utilisés sont listés dans le [tableau 2.2](#). Le couple d'oligonucléotides « CpGV-138300 » (Garnier *et al.*, 2009) amplifie aussi bien CpGV-M que CpGV-R5. Il servira comme contrôle positif, pour donner le 100% de référence de l'amplification pour les deux autres marqueurs. Deux couples d'oligonucléotides différenciant chacun des isolats ont été obtenus par comparaison des séquences génomiques de CpGV-M et CpGV-R5 (Chapitre 5) en utilisant le logiciel Clone Manager 9 (SciED Software, Morrisville, USA). Les deux marqueurs ciblent deux gènes différents ORF20 et ORF27 ([Tableau 2.2](#)). La spécificité d'amplification du couple « CpGV-15600 » est due à la liaison à 8 nucléotides sur le génome de CpGV-M, absent du génome de CpGV-R5. Ainsi, ce couple n'amplifie que CpGV-M. De la même manière, la spécificité du couple « CpGV-20400 » à CpGV-R5 est conférée par deux groupes de 3 nucléotides seulement présents dans le génome de CpGV-R5. Ce couple n'amplifie que CpGV-R5. Cette spécificité dans l'amplification a été testée expérimentalement.

9.2. Extraction ADN pour PCR quantitative

Une lyse des granules est appliquée pour extraire l'ADN viral. 100µL de tampon d'extraction (0.2M Na₂CO₃, 0.34M NaCl, 0.02M EDTA; pH=10.5) sont ajoutés à 100µL de solution virale (concentration = 1.10⁷ OB/µL) et incubés 30 minutes à 37°C. La solution est ensuite neutralisée avec 20 µL HCl 1M et ajustée à 0,5% de SDS avec 11 µL de SDS à 10%. Une centrifugation d'1 minute à 13000 rpm est ensuite réalisée et le surnageant est dilué au dixième avant utilisation.

9.3. PCR quantitative

La quantification des marqueurs spécifiques de CpGV-M et CpGV-R5 dans chaque échantillon a été effectuée par PCR quantitative. Une gamme étalon a été produite en utilisant le plasmide PCR2.1- TOPO- CpGV (192 ng/mL) (Garnier *et al.*, 2009). Des dilutions au 10^{ème} du PCR 2.1 CpGV allant de 4 à 4×10⁷ copies de génomes /µL sont utilisées. Un contrôle

négatif est systématiquement inclus. La gamme étalon, le contrôle négatif et les échantillons sont toujours effectués en triplicats. L'efficacité des réactions était supérieure à 0.9 et l'erreur standard était inférieure à 3 pour tous les points de la gamme étalon. La réaction de qPCR a été effectuée comme suivant. Le mix PCR a été préparé dans un volume final de 25 μ L et contenait 12,5 μ L de QuantiTect Probe PCR kit 2X (Quiagen, Courtabœuf, France), 500 nM d'oligonucléotides (MWG-Eurofins Operon, Courtaboeuf, France), 10X Sybergreen, 5 μ L d'ADN et de l'eau distillée qsp 25 μ L.

L'amplification PCR est effectuée en utilisant le thermocycleur Rotor gene 6600 (Corbett Life Science, Quiagen, Courtabœuf, France), avec le cycle suivant : une étape de pré-dénaturation de 15min à 95°C; suivi de 45 cycles de 15s à 95°C et 30s à 60°C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Rotor-gene 6000 Serie Software 1.7.65 (Corbett Life Science, Quiagen, Courtabœuf, France).

9.4. PCR dans la zone du gène *pe38*

Une étude récente a montré qu'une mutation de 24 nucléotides sur le gène *pe38* était responsable du contournement de la résistance de Cp par certains isolats viraux (Gebhardt *et al.*, 2014). Il n'a pas été possible de trouver des couples d'oligonucléotides permettant une discrimination par qPCR. Par contre, comme la différence entre les deux génotypes au niveau de ce marqueur (appelé « CpGV 18800 ») est une insertion de 24 paires de bases, une différenciation par taille était possible. Des oligonucléotides permettant de visualiser cette différence sur gel d'électrophorèse ont été dessinés. L'oligonucléotide «CpGV 18800 F » contient le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *PstI* et le l'oligonucléotide «CpGV 18800 R » contient celui de *BamHI*. La séquence de ces oligonucléotides est détaillée dans le [tableau 2.2](#).

Une extraction simplifiée par lyse des granules (cf : [9.2](#)) est réalisée. Une amplification PCR est ensuite réalisée dans les mêmes conditions qu'en [8.3](#) dans un volume final de 50 μ L avec le couple «CpGV 18800 ». Seule la température d'hybridation est modifiée (65°C au lieu de 60°C).

Après l'amplification PCR, une double digestion des produits PCR utilisant les enzymes *PstI* et *BamHI* est effectuée utilisant 5 μ L d'ADN dans un volume final de 15 μ L et incubé 3 heures à 37°C. Une migration des échantillons sur gel d'électrophorèse 3% (NoVaGel) dans un tampon tris-borate EDTA (TBE) est ensuite effectuée. Les fragments sont ensuite visualisés

sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium. La taille des fragments et la quantité d'ADN ont été estimées grâce au Kodak 1D image system (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

10. Persistance du virus dans les populations d'insectes en champ

Des larves diapausantes issues de populations naturelles ont été récupérées grâce à des bandes pièges placées en fin de saison dans des parcelles traitées au CpGV (Figure 2.2). Ces larves ont été élevées au laboratoire, puis accouplés. Les adultes ont été testés après accouplement, ainsi que leurs descendants.

Une détection du virus dans des individus morts récoltés en 2012 dans des parcelles traitées ou non au CpGV a été effectuée.

Le broyage des larves est effectué comme en 9.2 par pool de 5 provenant de la même parcelle. Entre 5 et 10 pools sont réalisés par parcelle. L'extraction ADN est effectuée comme en 8.2 et la détection par PCRq comme en 9.3.



Figure 2.2. Larves diapausantes utilisées dans nos expériences.

10.1. Extraction d'hémolymphe

Les larves sont au préalable lavées dans deux bains successifs de tris-SDS (0,01M tris/0,1% SDS) suivi d'un rinçage dans un bain d'H₂O. L'hémolymphe des larves a ensuite été extraite par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur effilée. Entre 3 et 6 µL d'hémolymphe ont été prélevés des larves

Tableau 2.2. Séquence des oligonucléotides utilisés, taille du fragment amplifié chez les virus CpGV-M et CpGV-R5 et technique d'amplification utilisée.

Localisation du marqueur	Primer 1	Primer 2	Taille du fragment		Référence	Technique
			CpGV-R5	CpGV-M		
138300	AACCGGTGCACGTTGCA	AGCACAGTTCGTCGGATTGG	59	59	Garnier <i>et al.</i> , 2009	PCRq
15600	ATCTATGAAGATGTTGCCGAG	TTATCCCCCTTGCAATTATCC	124	-	Graillot <i>et al.</i> , 2014	PCRq
20400	CAAGCTCATGAAAAGCTGTAGAC	TGATGACATTATTGATGATGAAG	-	96	Graillot <i>et al.</i> , 2015	PCRq
18800	CCGGCTGCAGCGAGTCGAGCACCACCATTA	CGCGGGATCCACGGGTGTGCATTAGCCACC	319	295	Graillot <i>et al.</i> , 2015	PCR/électrophorèse

10.2. Récupération des corps gras

Après extraction de l'hémolymphe, les larves sont broyées dans 200 μ L d'H₂O et filtrées sur gaze. Le broyat obtenu est ensuite dilué au 10^{ème}. Une extraction ADN simple par lyse des granules est ensuite réalisée (cf : 9.2). L'ADN extrait est ensuite dilué au 20^{ème}.

10.3. Analyse par PCR quantitative

La PCR est effectuée dans les mêmes conditions qu'en 9.3. La quantification n'a cependant pas été effectuée, il y a juste eu détection de marqueurs CpGV (Tableau 2.2).

Partie 1 : Variabilité entre différentes populations d'hôtes

Chapitre 3. Variation de sensibilité de trois colonies de laboratoire de carpocapse des pommes, *Cydia pomonella* au CpGV

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article (**Graillet, B., Blachère-Lopez, C., Besse, S., Siegwart, M. & Lopez-Ferber, M. (2013).** Variation in the susceptibility to CpGV in population of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Insect pathogens and entomoparasitic nematodes, IOBC-WRPS Bulletin*, **90**, 149-153.), ainsi que d'une présentation orale lors du meeting IOBC-WRPS 2013, section pathogènes d'insectes et nématodes à Zagreb, Croatie.

1. Introduction

L'utilisation de l'isolat mexicain CpGV-M (Tanada, 1964) pendant plus de 20 ans pour le contrôle du carpocapse en vergers a conduit à l'apparition de résistances en Allemagne (Fritsch *et al.*, 2005), en France (Sauphanor *et al.*, 2006) et dans d'autres parties de l'Europe (Jehle & Schmitt ; 2009 ; Schmitt *et al.*, 2013).

Pour comprendre ce phénomène, des investigations concernant le mécanisme de transmission de cette résistance au CpGV-M ont été réalisées suivant deux méthodes : sur des populations sauvages résistantes par croisements en masse, puis sur des individus résistants par croisements individuels. Les résultats obtenus après croisements en masse ont laissé penser à une résistance autosomale avec dominance incomplète (Eberle *et al.*, 2006). Cependant, les croisements individuels ont clairement indiqué une résistance monogénique liée au sexe dans les essais de laboratoire, tant sur les populations françaises (Berling *et al.*, 2007) qu'allemandes (Asser-Kaiser *et al.*, 2007). Ce dernier mode de transmission a également été confirmé pour les populations de terrain (Asser Kaiser *et al.*, 2009).

De récentes études, beaucoup plus détaillées, ont suggéré que ce mécanisme ne peut pas être le seul responsable de cette résistance et que l'action d'autres gènes est requise pour expliquer la réponse observée des populations naturelles et de laboratoire (Berling *et al.*, 2013). Le mode de transmission et le niveau de dominance de cette ou de ces autres déterminants

mineurs de résistance n'ont pas été complètement élucidés. (Berling *et al.*, 2013). Il a été suggéré que des populations d'origine différente pourraient présenter des variations pour ces autres gènes, ce qui se traduirait par une tolérance plus ou moins grande aux virus. Cette tolérance pourrait ne pas être spécifique à un isolat viral, comme la résistance observée envers CpGV-M. Son niveau ne permettait pas nécessairement aux insectes de survivre à des fortes doses, mais augmenterait leurs chances de survie à des faibles ou moyennes doses. Une communication montre que le niveau de variabilité génétique des populations de *C. pomonella* est important (Cheney *et al.*, 2008).

Des études préalables sur la variabilité de sensibilité d'insectes aux baculovirus ont été effectuées par le passé. Ces études ont été détaillées dans la partie introductive de la thèse ([Chapitre 1 - 3.2.4. Coévolution et stratégies adaptatives des baculovirus](#)).

Dans une étape préalable à l'homologation en France du CpGV-M, des essais de sélection de carpacopes résistants au CpGV-M ont été effectués dans des laboratoires de l'INRA. Ces tests n'ont pas permis l'obtention d'une colonie ayant une résistance accrue ; la colonie ayant complètement disparue en 9^{ème} génération (Biache *et al.*, 1998).

Cependant, le montage expérimental ne permettait pas de déterminer si des variations de tolérance existaient. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la réponse de trois colonies de laboratoire, deux sensibles au virus (Sv et CpNPP) et une résistante au CpGV-M (R_{GV}), à deux isolats viraux, l'un contournant la résistance (CpGV-R5) et l'autre ne la contournant pas (CpGV-M). Le but de ce travail est de mettre en évidence les différences de réponses des trois colonies aux isolats viraux et de montrer que deux populations, même sensibles au virus, présentent des différences de sensibilité. Il s'agit donc d'analyser non seulement leur réponse à des doses variables de virus, mais aussi leur niveau de survie à une dose forte.

Comme indiqué au préalable ([Chapitre 2, Matériel et Méthodes](#)), les colonies Sv et R_{GV} ont le même fond génétique, mise à part la présence pour R_{GV} du gène responsable de la résistance au CpGV-M, localisé sur le chromosome sexuel W. Par contre, le fond génétique de la colonie CpNPP est différent, leur origine géographique étant pour Sv le sud-est de la France et pour CpNPP, le nord-ouest.

2. Résultats

2.1. Analyse de la différence de sensibilité de trois colonies à deux isolats viraux

L'efficacité de CpGV-M et CpGV-R5 sur les colonies Sv, CpNPP et R_{GV} est décrite dans le [tableau 3.1](#). Comme attendu, CpGV-M est efficace sur les colonies sensibles (Sv et CpNPP) mais pas sur les insectes résistants (R_{GV}). L'isolat CpGV-R5 est, quant à lui, efficace sur les 3 colonies.

Tableau 3.1. Efficacité biologique de deux isolats de CpGV sur trois colonies de laboratoire.

Isolat viral utilisé	Colonie d'insectes	Nb. de témoins	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/μL (95% IC)		Pente ± ES	χ ²
				CL ₅₀	CL ₉₀		
CpGV-M	Sv	56	265	34,19 (23,74-46,41)	125,40 (85,69-239,73)	2,27 ± 0,39	3,78
	CpNPP	257	529	13,10 (6,55-23,2)	223,10 (110,7-654,18)	1,04 ± 0,09	5,99
	R _{GV}	135	261	7,84 × 10 ³ (660,45-4,13 × 10 ⁴)	1,17 × 10 ⁶ (2,15 × 10 ⁵ -6,72 × 10 ⁸)	0,55 ± 0,09	6,32
CpGV-R5	Sv	73	184	31,90 (4,13-105,64)	438,28 (127,32-1,94 × 10 ⁴)	0,13 ± 0,18	8,45
	CpNPP	257	533	6,760 (2,6-13,37)	59,63 (27,54-278,55)	1,36 ± 0,13	11,42
	R _{GV}	176	369	22,43 (13,73-34,36)	410,67 (240,16-846,43)	1,02 ± 0,11	3,60

La comparaison entre chaque modalité (combinaison isolat viral/colonie d'insectes) indique que chaque isolat a une action spécifique sur chacune des colonies d'insectes excepté CpGV-R5 qui présente le même effet sur Sv et R_{GV} (hypothèse d'égalité: $P > 0,05$, $\chi^2 = 1,04$, ddl = 2; hypothèse de parallélisme: $P > 0,05$, $\chi^2 = 0,34$, ddl = 1).

En comparant la réponse des colonies CpNPP et Sv à l'isolat CpGV-M, de faibles mais significatives différences sont détectées (hypothèse d'égalité: $P < 0,05$, $\chi^2 = 24,80$, ddl = 2; hypothèse de parallélisme: $P < 0,05$, $\chi^2 = 17,56$, ddl = 1), alors que l'isolat CpGV-R5 impacte ces colonies de façon similaire (hypothèse de parallélisme: $P > 0,05$, $\chi^2 = 1,02$, ddl = 1) mais avec une intensité différente (hypothèse d'égalité: $P < 0,05$, $\chi^2 = 30,40$, ddl = 2). Ces différences sont plus visibles sur les graphiques concentration/réponse ([Figures 3.1 et 3.2](#)).

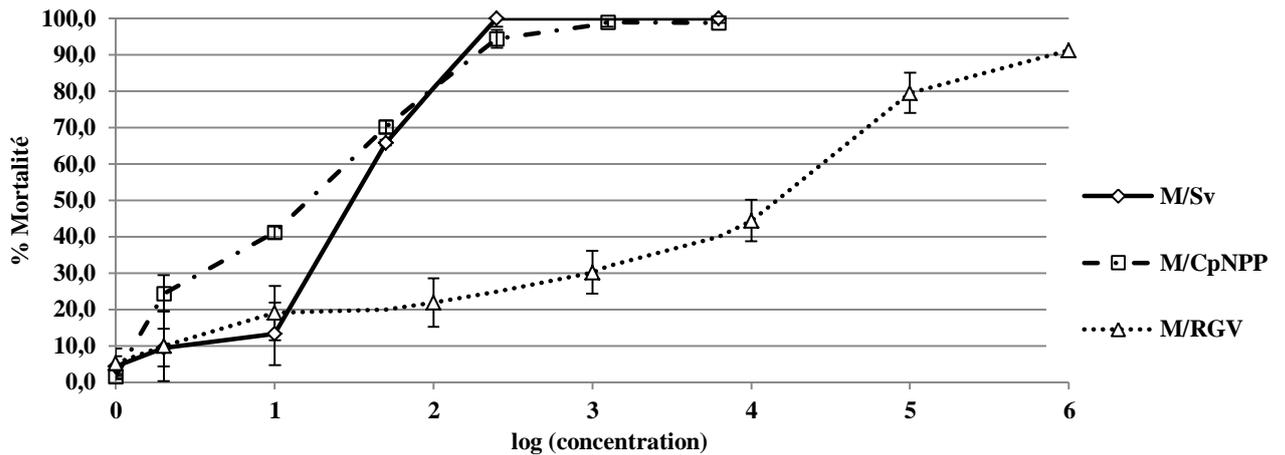


Figure 3.1. Concentration/mortalité de l'isolat CpGV-M sur trois colonies d'insectes

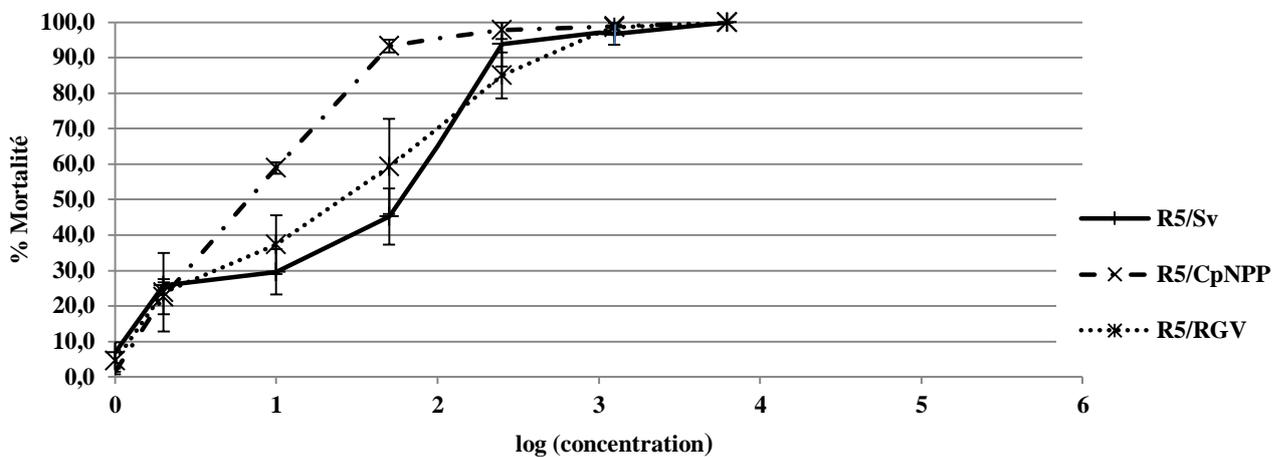


Figure 3.2. Concentration/mortalité de l'isolat CpGV-R5 sur trois colonies d'insectes

3. Discussion

L'effet du gène majeur de résistance (localisé sur le chromosome W) est clairement identifiable en comparant la réponse de ses colonies CpNPP et Sv et de la colonie R_{GV} lors d'un challenge avec CpGV-M (Figure 3.1). La différence de sensibilité observée, tant au niveau de la CL₅₀ que de la CL₉₀ entre les deux types de colonies est en accord avec les résultats publiés (niveau de résistance supérieure à 1000 fois) (Berling *et al.*, 2009). Cependant, des différences dans l'allure des courbes de réponse apparaissent. Les deux colonies Sv et R_{GV} réagissent de façon similaire aux faibles doses de CpGV-M, avec une mortalité faible, qui n'est pas différente de la mortalité naturelle pour des concentrations inférieures à 10 OB/μL. Par contre, la colonie CpNPP réagit dès les plus faibles doses. Cette

différence de sensibilité entre les deux populations sensibles au CpGV-M, CpNPP et Sv, peut être observée jusqu'aux doses d'environ 50 OB/ μ L. Pour des doses plus fortes, le comportement des deux populations devient équivalent.

Des différences du même type peuvent être observées lors du challenge avec l'isolat CpGV-R5. Les deux colonies Sv et R_{GV}, présentent un comportement similaire, ce qui est logique : elles ont le même fond génétique, mis à part le gène de résistance au CpGV-M qui n'affecte pas la réplication de CpGV-R5. Ces deux populations sont cependant moins sensibles que CpNPP. Les courbes dose/réponse ne se rejoignent que pour des mortalités proches du 100%, à la différence de ce qui était observé avec CpGV-M.

Le test statistique montre des différences dans le parallélisme de la régression réponse/dose. Ces différences reflètent sans doute la manière singulière de chaque virus pour contrôler le cycle d'infection dans son hôte. Ainsi, CpGV-R5 apparaît plus agressif pour les deux fonds génétiques d'hôte : il n'y a pas de plateau pour les faibles doses. Ceci suggère une infection primaire très efficace, tandis que CpGV-M aurait besoin d'une plus grande concentration de virus pour déclencher des effets pathogènes, ce qui n'implique pas, *a priori*, une absence de réplication ou de transmission. En effet, rien n'indique que les larves survivantes ne sont pas infectées, et ne sont pas capables de transmettre l'infection.

Dans une colonie de laboratoire résistante allemande (CpRR1), le point de blocage de l'infection de CpGV-M apparaît être une incompatibilité au niveau cellulaire : le virus n'arrive pas à se répliquer dans les tissus de l'hôte résistant (Asser-Kaiser & Jehle, 2009 ; Asser-Kaiser *et al.*, 2011), même s'il semble que CpGV-M arriverait à rentrer dans ses cellules. Les études réalisées antérieurement (M. Berling, thèse de doctorat, 2009) n'ont pas permis de trouver des différences entre le mode de résistance de R_{GV} et de CpRR1. Le gène viral impliqué dans le contournement de la résistance vient d'être déterminé. Il s'agit du gène *pe38*, dont la fonction reste encore inconnue (Gebhardt *et al.*, 2014).

Cette capacité d'effet pathogène à plus faible dose pourrait se traduire par une mortalité plus rapide. Dans nos conditions expérimentales il n'est pas possible de faire des déterminations précises du temps de survie. En général, une mortalité plus rapide s'accompagne d'une productivité plus faible. Cette productivité a été mesurée, et nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives ([Partie 2, Chapitre 4](#); Graillot *et al.*, 2014).

En condition de faible prévalence du virus, le fond génétique de Sv et de R_{GV} pourrait être suffisant pour bloquer l'infection, indépendamment de l'isolat viral utilisé.

La variabilité de sensibilité de populations naturelles à l'infection par un isolat viral a été décrite chez d'autres baculovirus (Briese, 1986; Abot *et al.*, 1996). La possibilité de sélection d'une population avec une sensibilité réduite au CpGV basée sur le mécanisme précédemment décrit reste possible. Ce mécanisme ne discriminerait peut-être pas les isolats de la même façon que la résistance actuellement présente dans les vergers européens. Dans le cadre du projet PURE, l'INRA (Unité 1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, équipe Ecologie de la Production intégrée) a réalisé des essais de sélection de ce type de résistance à partir des populations d'insectes collectées en champ, mais les résultats n'ont pas été, à ce jour, concluants. Par contre, une communication récente (Sauer *et al.*, 2014) fait état d'une résistance différente isolée en Allemagne, qui pourrait confirmer cette possibilité.

4. Conclusion de la partie

Il a été clairement montré dans ce chapitre que des populations, au premier abord, sensibles au CpGV présentaient des différences de réponse aux différents isolats viraux. Ce phénomène n'est pas anodin car il est décrit chez plusieurs espèces d'insectes et pourrait être un des facteurs clef à explorer pour comprendre certains mécanismes d'apparition de résistances. Certains échecs dans la protection des vergers pourraient être dus à de légères différences dans la sensibilité des insectes. Ces différences ne sont pas faciles à détecter en utilisant les protocoles standards en laboratoire (pourcentages de survie à une forte dose par test unique). Des tests plus précis, avec des points multiples, se heurtent à la difficulté de disposer d'un nombre suffisant d'individus issus de populations prélevées au verger.

Partie 2 : Adaptation du virus à des hôtes non-permissifs

Chapitre 4. Adaptation progressive d'un isolat de CpGV aux populations de carpocapses résistantes à CpGV-M

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre sont à l'origine de la publication : **Grillot, B., Berling, M., Blachere-López, C., Siegart, M., Besse, S. & López-Ferber, M.** 2014. Progressive adaptation of a CpGV isolate to codling moth populations resistant to CpGV-M. *Viruses*. **6**, 5135-5144.

1. Introduction

Les cas de résistance chez le carpocapse des pommes relevés dans les vergers après l'usage exclusif de CpGV-M pendant de très nombreuses années (Fritsch *et al.*, 2005 ; Sauphanor *et al.*, 2006 ; Schmitt *et al.*, 2013) ont obligé la recherche à trouver rapidement un moyen de contourner ce phénomène pour contrôler ces populations d'insectes.

De nombreux isolats ont été identifiés pour leur efficacité partielle sur les individus résistants. Parmi ces isolats, NPP-R1 présentait des caractéristiques intéressantes, il a donc été choisi comme isolat de départ pour un processus de sélection (Berling *et al.*, 2009) (Figure 4.1).

Les populations de virus présentent une diversité génétique naturelle qui pourrait leur permettre d'évoluer lorsque les conditions autorisent une adaptation du pathogène à l'hôte. Pour tester cette capacité d'évolution, un processus de sélection a été mis en œuvre par passages successifs de l'isolat NPP-R1 sur des insectes de laboratoire résistants à CpGV-M (R_{GV}) dans le but d'accroître son efficacité. L'efficacité et la spécificité de l'isolat NPP-R1 et de son 4^{ème} passage sur larves résistantes, 2016-r4, ont été décrites par Berling *et al.* (2009). Cette étude a montré une augmentation de l'activité du virus après quatre passages sur insectes résistants.

Le procédé a ensuite été poursuivi jusqu'au 16^{ème} passage. L'efficacité et les différences génotypiques de ces passages ont été évoquées dans la thèse de Berling M. (2009) mais ces données n'ont jamais été publiées (Figure 4.1). Nous avons donc repris certains résultats de cette thèse que nous avons complétés avec des tests d'efficacité au bout du 8^{ème} passage

(2016-r8) et du 16^{ème} passage, 2016-r16 (dont le nom homologué est CpGV-R5) sur une colonie d'insectes sensibles, une colonie d'insectes résistants, et pour certains passages, sur une colonie génétiquement hétérogène, composée d'environ 10% d'insectes résistants et 90% d'insectes sensibles. En vue d'obtenir des informations sur le coût évolutif du contournement de la résistance pour le virus, des tests de production comparative ont été effectués (sur la colonie la plus sensible à notre disposition, CpNPP), en utilisant comme référence CpGV-M. Pour compléter cette analyse, nous avons étudié le maintien de la capacité de contournement de la résistance de CpGV-R5 en absence de sélection. Pour cela, l'isolat CpGV-R5 a été produit pendant 20 générations sur insectes sensibles et l'efficacité de ces passages a été testée sur une population d'insectes résistants. Le plan des expériences de ce chapitre est exposé en [figure 4.2](#).

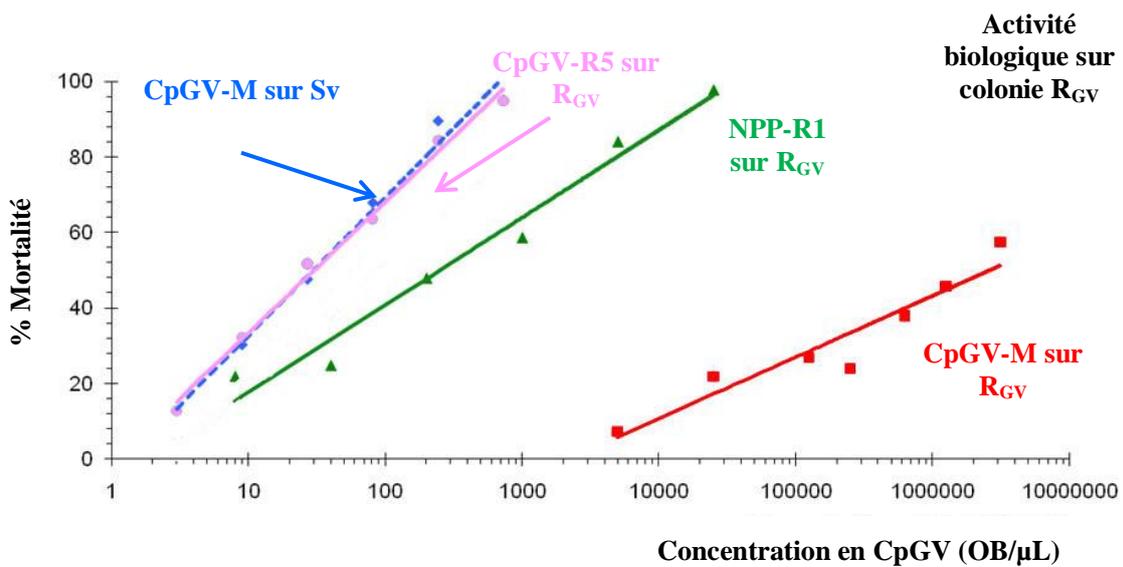


Figure 4.1. Efficacité de CpGV-M, NPP-R1 et CpGV-R5 sur colonie sensible Sv et résistantes R_{GV}. D'après Berling, 2009.

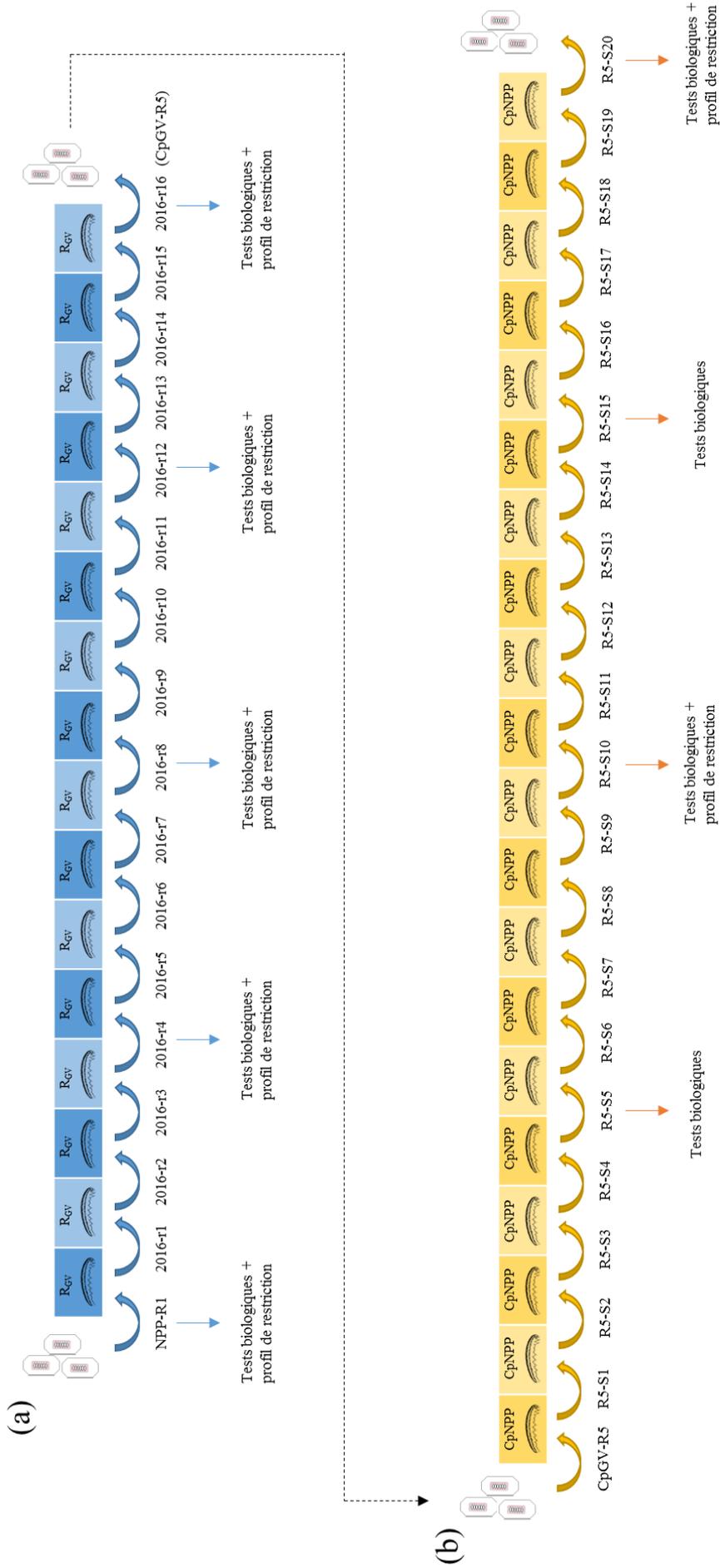


Figure 4.2. Plan d'expérience du chapitre 4 **(a)** Production successive de l'isolat NPP-R1 pendant 16 générations sur hôte résistant R_{GV} **(b)** Production successive de l'isolat CpGV-R5 sans pression de sélection sur colonie sensible CpNPP pendant 20 générations. Les tests biologiques ont été effectués sur larves sensibles CpNPP, résistantes R_{GV} et population hétérogène, CpLGEI.

2. Résultats

2.1. Analyse des profils de restriction de l'isolat NPP-R1 après passage sur insectes résistants

Les ADN de NPP-R1 et de tous les passages ont été comparés à celui de CpGV-M en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *SalI* and *XhoI*. Des fragments submolaires ont été observés chez tous les isolats, mais leurs proportions changent au cours des passages. Le pattern caractéristique de CpGV-M, en accord avec la séquence publiée, a été observé pour toutes les enzymes dans l'isolat NPP-R1, mélangé avec un nouveau pattern, caractérisé par un site *EcoRI* supplémentaire autours de la position 58000, la disparition d'un site *BamHI* en 17745, l'apparition de deux sites *PstI* en 38800 et 86450, l'apparition de deux sites *SalI* en 13100 et 49000. Aucune différence n'a été observée sur le profil de *XhoI*. Du passage 4 au passage 16, ce nouveau profil devient plus fréquent (bandes de plus en plus visibles). Après le 16^{ème} passage, le profil de CpGV-M devient indétectable. Ces changements sont présentés dans la [figure 4.3](#).

2.2. Production virale des différents isolats

Une analyse de la différence de production virale sur larves sensibles au virus (CpNPP) entre les isolats a été effectuée. Nos résultats ne permettent pas de détecter des différences de production entre CpGV-M, 2016-r8 et 2016-r16 (Test de Kruskal-Wallis : $\chi^2 = 29$, ddl = 28, P = 0,4125) ([Tableau 4.1](#)).

Tableau 4.1. Production par larve et par gramme de larve de trois isolats viraux sur colonie sensibles au virus, CpNPP.

Isolats viraux	Production par gramme de larves ($\times 10^{11}$ OB/g) +/- ES	Production par larve* ($\times 10^{10}$ OB/g) +/- ES
CpGV-M	4,84 +/- 0,29 (a)	2,48 +/- 0,1 (b)
2016-r8	5,77 +/- 0,29 (a)	2,99 +/- 0,19 (b)
2016-r16 (=CpGV-R5)	5,41 +/- 0,16 (a)	2,54 +/- 0,11 (b)

* Production moyenne d'une larve estimée sur 10 pools de 3 larves. Des lettres similaires indiquent l'absence de différence statistique significative par test de Kruskal Wallis.

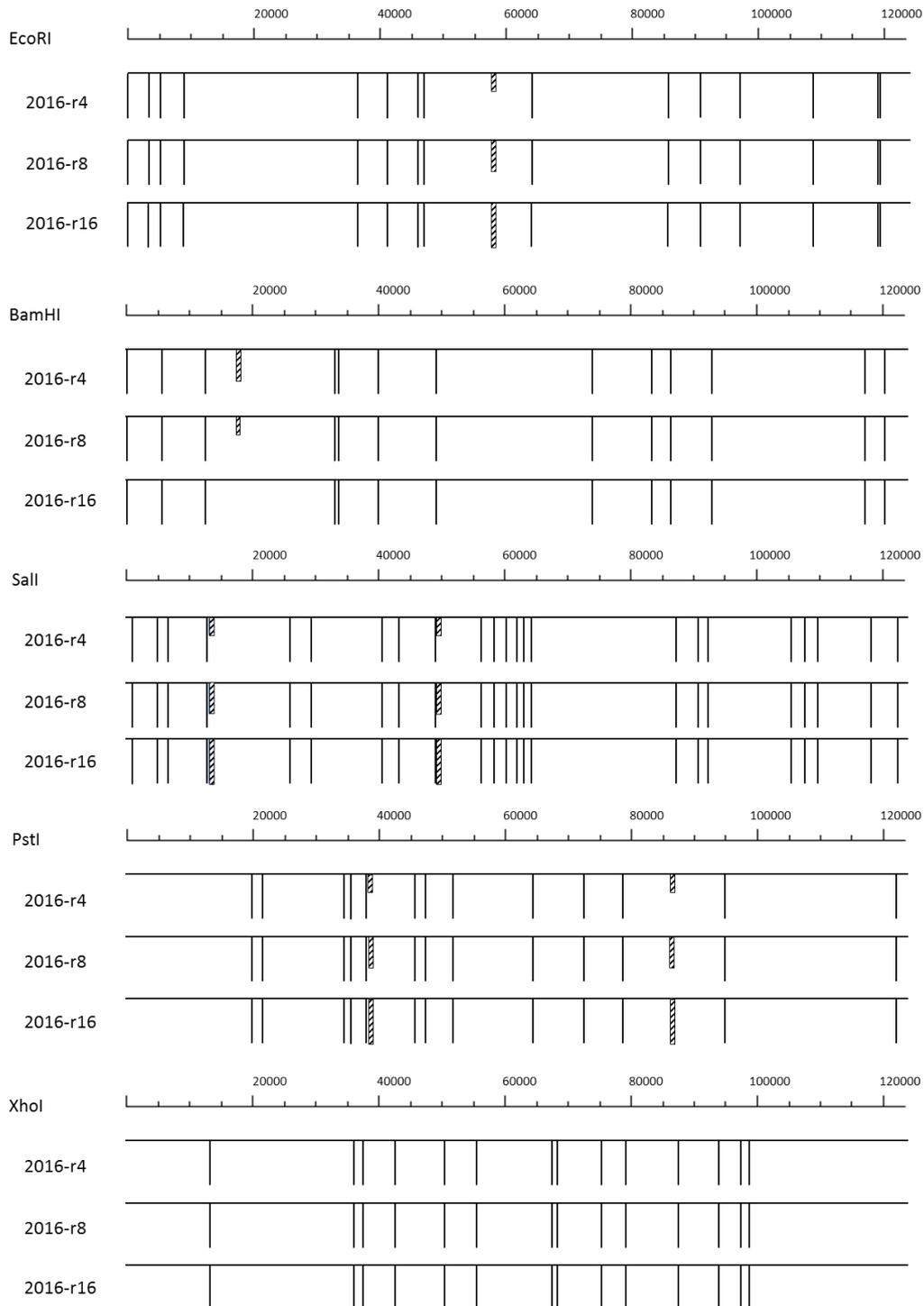


Figure 4.3. Représentation schématique des génomes des isolats de CpGV obtenus après amplifications séquentielles sur larves résistantes R_{GV} . La proportion relative des sites de restriction variable est représentée par des rectangles hachurés. Leur taille est proportionnelle à leur abondance relative. Les sites de restriction partagés par les trois isolats sont représentés par des lignes de taille égale.

2.3. Tests biologiques

Des tests d'efficacité ont été effectués avec les isolats NPP-R1, 2016-r4 (données provenant de Berling *et al.* 2009), 2016-r8 et 2016-r16 sur larves sensibles et résistantes. L'efficacité de chacun des isolats viraux a été estimée (Tableau 4.2).

Sur larves sensibles, les isolats NPP-R1, 2016-r4 et 2016-r8 sont moins efficaces que l'isolat CpGV-M. Étonnamment, l'isolat 2016-r16 est plus efficace (CL_{50} : 6,76 OB/ μ l (2,6 - 13,37); CL_{90} : 59,63 OB/ μ l (27,54 - 278,55)) que l'isolat CpGV-M (CL_{50} : 13,10 OB/ μ l (6,55 - 23,20); CL_{90} : 223,10 OB/ μ l (110,70 - 654,18)). Sur larves résistantes, une augmentation de l'efficacité est observée jusqu'à l'isolat 2016-r8. L'isolat 2016-r16 possède une CL_{50} légèrement plus faible (22,43 OB/ μ l (13,73 - 34,36)) et une LC_{90} similaire (410,67 OB/ μ l (240,16 - 846,43)) à 2016-r8 (CL_{50} : 41,27 OB/ μ l (26,97 - 58,96); CL_{90} : 319,24 OB/ μ l (207,87 - 582,06)) indiquant que l'isolat 2016-r16 est complètement stabilisé. L'isolat CpGV-M n'est pas capable de contrôler efficacement la colonie hétérogène contenant 10% de larves résistantes (LC_{50} : 123,93 (6,69 - $1,32 \times 10^3$) ; LC_{90} : $2,7 \times 10^4$ ($2,07 \times 10^3$ - $3,36 \times 10^9$)) alors que CpGV-R5 contrôle parfaitement cette population (LC_{50} : 20,21 (13,94 - 27,95) ; LC_{90} : 93,09 (62,571 - 169,547)).

Tableau 4.2. Pathogénicité mesurée par CL₅₀ et CL₉₀, de cinq isolats viraux sur une colonie de laboratoire de *C. pomonella* sensible, une colonie résistante à CpGV-M et une colonie hétérogène .

Colonie hôte	Isolats viraux	Nb. d'insectes testés	Nb. D'OB/ μ l (95% IC)		Pente \pm ES	χ^2	Facteur de résistance	
			CL ₅₀	CL ₉₀			CL ₅₀	CL ₉₀
Sensible	CpGV-M	786	13,10 (6,55-23,20)	223,10 (110,70-654,18)	1,04 \pm 0,09	5,99	1	1
	NPP-R1 ^(b)	689	25,80 (14,48-39,93)	328,55 (196,93-702,51)	1,16 \pm 0,13	1,28	2	1,5
	2016-r4 ^(b)	999	39,65 (6,40-133,91)	805,85 (260,20-1,36 \times 10 ³)	0,98 \pm 0,11	13,6	3	3,5
	2016-r8	445	48,37 (21,18-81,44)	280,52 (158,02-857,03)	1,68 \pm 0,25	4,67	3,7	1,3
	2016-r16 (CpGV-R5)	790	6,76 (2,6-13,37)	59,63 (27,54-278,55)	1,36 \pm 0,13	11,42	0,5	0,25
Résistant	CpGV-M	396	7,84 \times 10 ³ (660,45-4,13 \times 10 ⁴)	1,71 \times 10 ⁶ (2,15 \times 10 ⁵ -6,72 \times 10 ⁸)	0,55 \pm 0,09	6,32	600	7665
	NPP-R1 ^(b)	578	166,31 (91,21-278,27)	1,28 \times 10 ⁴ (5,95 \times 10 ³ -3,80 \times 10 ⁴)	0,70 \pm 0,08	4,81	13	57
	2016-r4 ^(b)	1201	102,31 (63,20-146,91)	1,57 \times 10 ³ (1,01 \times 103-2,97 \times 10 ³)	1,10 \pm 0,10	6,21	7,8	7
	2016-r8	456	41,27 (26,97-58,96)	319,24 (207,87-582,06)	1,44 \pm 0,17	1,83	3,2	1,5
	2016-r16 (CpGV-R5)	545	22,43 (13,73-34,36)	410,67 (240,16-846,43)	1,02 \pm 0,11	3,60	1,7	1,8
Mélangée	CpGV-M	873	123,93 (6,69-1,32 \times 10 ³)	2,7 \times 10 ⁴ (2,07 \times 10 ³ -3,36 \times 10 ⁶)	0,55 \pm 0,05	27,31	9,5	121
	2016-r16 (CpGV-R5)	415	20,21 (13,94-27,95)	93,09 (62,571-169,547)	1,93 \pm 0,27	1,28	1,5	0,4

^(a)La pathogénicité de CpGV-M sur larves sensibles est utilisée comme référence.

^(b) Ces résultats ont été publiés par Berling et al. (2009)

2.4. Analyse du coût pour l'isolat CpGV-R5 à contourner la résistance des insectes

Dans le but de tester un éventuel coût pour le virus CpGV-R5 à contourner la résistance, 20 passages successifs de ce virus ont été réalisés sur insecte sensibles CpNPP (PR5-S1 à PR5-S20). Des tests d'efficacité ont ensuite été effectués avec les passages 0 (correspondant à CpGV-R5), 5, 10, 15 et 20 (respectivement PR5-S5, PR5-S10, PR5-S15 et PR5-S20) sur larves résistantes R_{GV} et sensibles CpNPP. Ces résultats sont indiqués sur le [tableau 4.3](#). Aucune tendance allant vers la perte d'efficacité sur insectes résistants n'est détectée entre ces cinq isolats ([Figure 4.4](#)). L'efficacité de ces productions sur insectes sensibles CpNPP tend vers celle de CpGV-M sur CpNPP.

Tableau 4.3. Pathogénicité mesurée par CL_{50} et CL_{90} , de l'isolat CpGV-R5 et des passages 5, 10, 15 et 20 sur une colonie de laboratoire de *C. pomonella* sensible, CpNPP, et une colonie résistante à CpGV-M, R_{GV} .

Colonie hôte	Isolats viraux	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/ μ l (95% IC)				Pente \pm ES	χ^2
			CL_{50}	PR	CL_{90}	PR		
CpNPP	CpGV-R5	790	6,76 (2,6-13,37)	0	59,63 (27,54-278,55)	0	1,36 \pm 0,13	11,42
	PR5-S5	550	97,85 (68,48-133,83)	0,07 (0,44-0,11)	573,01 (389,51-982,64)	0,10 (0,06-0,19)	1,67 \pm 0,2	1,31
	PR5-S10	547	24,79 (17,114-34,61)	0,27 (0,17-0,44)	186,88 (122,70-331,77)	0,32 (0,17-0,61)	1,46 \pm 0,16	0,64
	PR5-S15	539	44,16 (31,48-59,96)	0,15 (0,1-0,24)	240,15 (162,53-419,44)	0,25 (0,13-0,46)	1,74 \pm 0,21	1,48
	PR5-S20	803	28,24 (15,67-47,52)	0,24 (0,16-0,37)	281,17 (148,27-762,80)	0,21 (0,12-0,39)	1,28 \pm 0,11	6,31
R_{GV}	CpGV-R5	545	22,43 (13,73-34,36)	0	410,67 (240,16-846,43)	0	1,02 \pm 0,11	3,60
	PR5-S5	453	86,58 (59,79-121,37)	0,26 (0,15-0,46)	671,18 (436,05-1,21 $\times 10^3$)	0,61 (0,28-1,36)	1,44 \pm 0,16	9,64
	PR5-S10	671	64 (20,34-130,58)	0,35 (0,19-0,65)	856,75 (389-3,79 $\times 10^3$)	0,48 (0,22-1,06)	1,14 \pm 0,12	8,35
	PR5-S15	646	31,61 (22,70-42,41)	0,71 (0,41-1,23)	249,23 (172,98-401,58)	1,65 (0,78-3,49)	1,43 \pm 0,14	2,16
	PR5-S20	458	55,62 (24,88-99,39)	0,40 (0,22-0,76)	470,72 (246,62-1,41 $\times 10^3$)	0,87 (0,39-1,97)	1,38 \pm 0,17	4,54

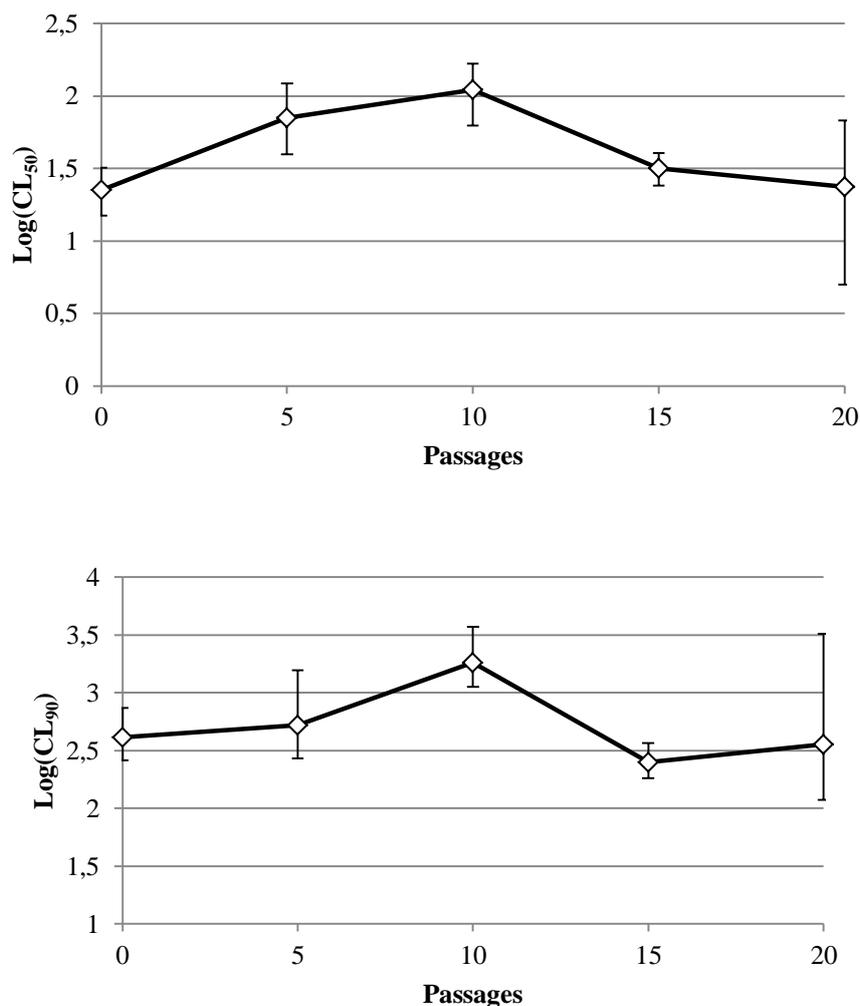


Figure 4.4. Evolution de l'efficacité de CpGV-R5 sur larves résistantes R_{GV} après passages sur larves sensibles.

Une analyse par profils de restriction utilisant 4 enzymes (*Pst*I, *Bam*HI, *Eco*RI et *Sal*I) a été effectuée sur les virus CpGV-M, CpGV-R5, PR5-S10 et PR5-S20. Cette analyse révèle des différences entre les profils (Figure 4.5). Les profils de PR5-S10 et PR5-S20 sont similaires sauf pour la seconde bande obtenue avec l'enzyme *Bam*HI sur PR5-S10 non retrouvée sur PR5-S20. Il est intéressant de noter que, dans chaque profil, des bandes présentes dans CpGV-M et non retrouvées dans CpGV-R5 sont présentes dans les profils de PR5-S10 et PR5-S20 (voir figure 4.5).

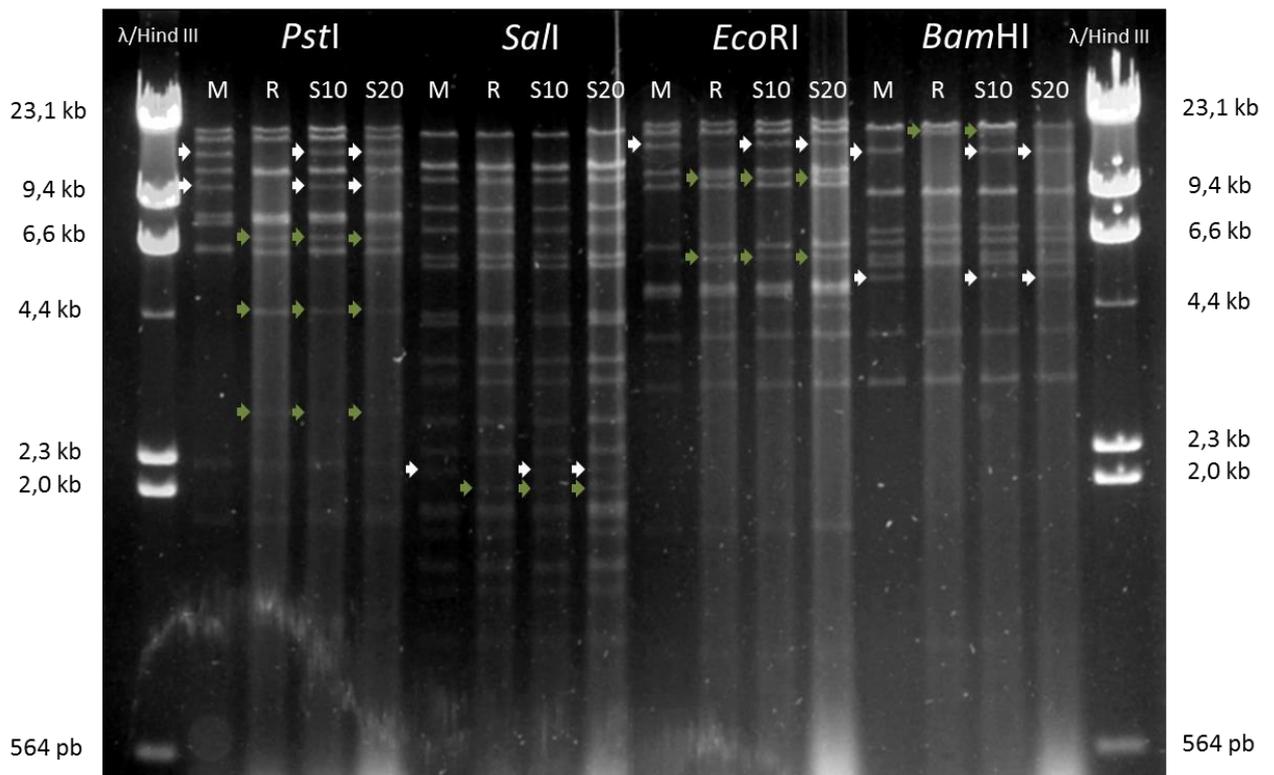


Figure 4.5. Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % de l'ADN de CpGV-M, CpGV-R5, R5S10 et R5S20 digéré par les enzymes de restriction *Pst*I, *Sal*I, *Eco*RI et *Bam*HI. (λ /HindIII): marqueur de poids moléculaire: ADN de phage lambda digéré avec *Hind*III. Les flèches blanches représentent des bandes normalement spécifiques de CpGV-M et les flèches vertes celles spécifiques à CpGV-R5.

3. Discussion

Les populations résistantes ne répondent pas au contrôle par CpGV-M. Les niveaux de résistance sont variables, d'un facteur de résistance de 100 à 1000 en fonction de la proportion relative de génotype résistant. La colonie résistante, R_{GV} , développée à partir d'une population naturelle, présente un niveau de résistance homogène à CpGV-M d'un facteur 7665 pour la CL_{90} en comparaison avec la colonie sensible. Cette homogénéité a permis une estimation précise de la résistance, la sélection d'un isolat, et l'évaluation du gain d'efficacité au cours des passages. L'isolat NPP-R1 était partiellement capable de contrôler les insectes résistants mais le ratio d'efficacité (CL_{90} sur insectes résistants/ CL_{90} sur insectes sensibles=57) n'était pas satisfaisant pour une utilisation en vergers, requérant l'application d'une dose trop forte pour être compatible avec les contraintes économiques du marché.

L'efficacité de NPP-R1 augmente au fur et à mesure des passages sur larves résistantes jusqu'à l'isolat 2016-r8 (8^{ème} passage). L'efficacité du 16^{ème} passage (2016-r16) est comparable à 2016-r8, indiquant une stabilisation de l'isolat.

Une première tentative pour caractériser l'isolat viral NPP-R1 et son évolution après sélection a été effectuée en utilisant une approche par analyse de profils enzymatiques. Cette approche a permis de démontrer que l'isolat original était composé d'au moins deux génotypes, dont un similaire à CpGV-M (Berling *et al.*, 2009) et que la proportion relative de ce génotype diminuait au fur et à mesure des passages sur insectes résistants. Le génotype sélectionné est caractérisé par la modification de différents sites de restrictions sur son génome. Il a récemment été montré qu'une modification au niveau du gène *pe38* est responsable du contournement de la résistance (Gebhardt *et al.*, 2014). Ce gène est situé entre 18574 et 19722 nt sur CpGV-M (Luque *et al.*, 2001). Les différences observées ici n'affectent pas cette région. En conséquence, il est probable qu'elles ne présentent pas une valeur sélective.

L'isolat 2016-r16 est capable de contrôler efficacement la colonie résistante et la colonie hétérogène. Étonnamment, cet isolat est aussi capable de contrôler la population sensible aussi bien, voire mieux, que l'isolat de référence CpGV-M, permettant son utilisation sur les populations de vergers présentant des niveaux variables de résistance.

La production virale sur larves sensibles a été comparée pour les isolats 2016-r8, 2016-r16 et l'isolat de référence CpGV-M. Aucune différence de production n'a été détectée, que l'on considère la production d'OB par larve ou par gramme de larve.

La production d'OB dans nos conditions expérimentales paraît être plus forte que celle publiée par d'autres auteurs ($2,5 \times 10^9$ OB/larve (Eberle *et al.*, 2012)). Ces différences sont probablement le reflet du protocole d'élevage des insectes et de purification du virus. En utilisant des conditions différentes, Reiser *et al* (1993) ont obtenu une concentration de $1,7 \times 10^{10}$ OB/larve.

Nous avons effectué quelques tests pour vérifier s'il existait une différence de temps léthal entre les trois isolats ; cette caractéristique pouvant être liée aux différences de production, mais ces expérimentations se sont révélées peu concluantes. Par contre, notre expérience lors de la production de stocks viraux ne révèle aucune différence sensible de temps léthal entre ces trois isolats.

De plus, aucune perte d'efficacité sur insectes résistants (R_{GV}) n'a été observée après productions successives de l'isolat CpGV-R5, capable de contourner la résistance, sans pression de sélection (sur larves sensibles). Si contourner la résistance avait un coût pour le virus, il aurait pu/dû perdre progressivement son efficacité sur larves résistantes au cours des passages sur hôte permissif. Cela confirme l'hypothèse d'absence de coût énoncée après étude de la production du virus. Il est intéressant de noter qu'après plusieurs générations d'amplification de l'isolat CpGV-R5 sur un hôte permissif, des bandes similaires à CpGV-M, disparues après sélection de l'isolat sur hôte non-permissifs, réapparaissent.

Une étude récente indique l'absence totale de coût pour l'insecte à devenir résistant au virus au laboratoire (Undorf-Spahn *et al.*, 2012). Une étude similaire sur des populations sauvages résistantes tire les mêmes conclusions (Siegwart, M. Communication personnelle). Les niveaux de production et d'efficacité similaires des isolats viraux capables de contourner la résistance sur les différentes colonies d'insectes (sensibles et résistantes) suggèrent une absence de coût génétique pour le virus à contrôler les populations résistantes.

4. Conclusion

L'isolat 2016-r16 (CpGV-R5) est donc capable de contrôler efficacement les populations résistantes à CpGV-M et les populations sensibles aussi bien que CpGV-M ainsi que les populations hétérogènes. Cet isolat est maintenant commercialisé par l'entreprise Natural Plant Protection SAS sous la dénomination commerciale "Carpovirusine™ Evo2".

Si, comme nos résultats le sous-entendent, il n'y a aucun coût génétique pour le virus à contrôler ces populations, quel est l'intérêt de la préservation de CpGV-M dans la nature ? Il est impossible de répondre à cette question en n'utilisant que les paramètres de valeur sélective décrits ici.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons séquencé le génome de 5 isolats viraux pour essayer de relier l'impact de certaines modifications génétiques à l'efficacité biologique des isolats ; puis nous avons réalisé une analyse des gènes positivement sélectionnés. Ces résultats sont décrits dans le [chapitre 5](#).

Chapitre 5. Comparaison de séquences de cinq isolats de *Cydia pomonella* granulovirus : détection des gènes positivement sélectionnés

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article (**Graillet, B., Besse, S., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. & Lopez-Ferber, M. (2013)**). Sequence analysis of CpGV-R5 isolate able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome. *Insect pathogens and entomoparasitic nematodes, IOBC-WRPS Bulletin*, **90**, 195-199.), ainsi que d'une présentation sous forme de poster lors du meeting IOBC-WRPS 2013 section pathogènes d'insectes et nématodes à Zagreb, Croatie.

L'analyse détaillée des génomes et la recherche des gènes sélectionnés positivement font partie d'un manuscrit en cours de préparation (**Graillet, B., Palma, L., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. Besse, S., & Lopez-Ferber, M.** Detecting positively selected genes between CpGV isolates.)

1. Introduction

Les méthodes de séquençage étant devenues de plus en plus performantes au fil des années, le nombre de génomes séquencés est à ce jour important. Le premier génome de baculovirus (*Autographa californica* MNPV (AcMNPV), clone C6) a été séquencé en 1994 (Ayres *et al.*, 1994), et, à titre d'exemple, trois étaient séquencés en 1997 (Posse & Rohrmann, 1997). Aujourd'hui, plus de 60 génomes complets de baculovirus sont disponibles, à savoir 16 de GV et 49 de NPV (GenBank, données de décembre 2014). Il existe une grande variété de tailles de génomes chez les baculovirus, allant de 80kb à 180kb. Elle se retrouve au niveau des gènes qui au nombre de 89 ORF pour le plus petit (*Neodiprion sertifer* NPV (Nese NPV)) (Garcia-Maruniak *et al.*, 2004) atteignent 181 ORF pour le plus grand (*Xestia c-nigrum* GV (Xecn GV)) (Van Oers & Vlak, 2007). L'analyse de génomes de différents isolats de la même espèce virale a permis de mettre en évidence la diversité des baculovirus (Zhang *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2005, Thézé *et al.*, 2014).

Les séquences codantes chez les baculovirus sont également distribuées sur les deux brins d'ADN et les régions intergéniques sont réduites (Van Oers & Vlak, 2007). Dans toute la famille des *Baculoviridae*, 37 gènes strictement conservés (qui sont appelés les « core genes ») ont été identifiés (Van Oers & Vlak, 2007; Harrison, 2009; Garavaglia *et al.*, 2012) et classifiés en 5 groupes : les gènes impliqués dans la transcription de l'ARN, la réplication de l'ADN, les protéines structurales, les protéines auxiliaires et les gènes ayant une fonction encore inconnue (Herniou *et al.*, 2003). Un total de 62 gènes communs sont détectés chez tous les baculovirus de lépidoptères (Herniou *et al.*, 2003; Jehle *et al.*, 2006) et sont impliqués dans les fonctions biologiques basiques du virus comme l'infection des cellules ou encore dans la structure des virions (Rohrmann, 2013; Miele *et al.*, 2011).

Le génome complet de l'isolat CpGV-M, clone 1 (CpGV-M1), a été complètement séquencé par Luque *et al.* (2001). Les auteurs ont révélé que celui-ci comportait 143 ORF pour une taille de 123 500 nucléotides. Suite au séquençage du génome d'AcMNPV, la présence de régions répétées ayant comme noyau un site *EcoRI* avait été décrite. Ces régions ont été appelées *hr* pour « highly repeated » regions. Avec le séquençage d'autres génomes, il apparaît que la présence de régions *hr* est commune à tous les baculovirus, mais que leur séquence est variable. En effet, dans d'autres génomes il n'y a pas conservation de ces sites de restriction. Les zones contenant des régions *hr* sont des hauts-lieux de recombinaison intragénomique (Van Oers & Vlak, 2007), contribuant à la plasticité génotypique des baculovirus. Il semble que ces régions agissent aussi en *cis*-activateur de la transcription des gènes précoces chez AcMNPV (Lu & Miller, 1997) et pourraient fonctionner comme origine de réplication (Kool *et al.*, 1994). Le polymorphisme des régions *hr* est souvent dû à un nombre variable de motifs répétés. Pour CpGV-M, une zone répétée majeure et 13 copies d'un palindrome imparfait mesurant 73-77 pb sont distribuées au sein du génome (Luque *et al.*, 2001 ; Hilton & Winstanley, 2007) et jouerait le rôle des *hr*.

Pour en revenir à notre modèle d'étude, il a été indiqué qu'il n'y avait aucun coût pour l'insecte à mettre en place une résistance à l'isolat viral CpGV-M au laboratoire (Undorf-Spahn *et al.*, 2012). Peu de tests ont été effectués mais il semble en être de même pour le virus qui ne montre pas de coût pour le contournement de cette résistance (voir [chapitre 3](#)). Comment expliquer le maintien de CpGV-M dans les populations naturelles si aucun coût à contourner la résistance ne se manifeste ? Par ailleurs, dans le [chapitre 3](#), nous avons analysé la variabilité de susceptibilité de trois colonies de laboratoire (deux fonds génétiques

différents). Est-ce que les différents isolats viraux subissent des pressions de sélection leur permettant de mieux surmonter les contraintes de chaque hôte ?

Une approche pour aborder ces questions est l'analyse comparée des séquences des génotypes caractéristiques de ces isolats. Cinq isolats viraux ont été choisis pour leur diversité d'efficacité sur carpocapses résistants. La séquence consensus de chacun des isolats a été déterminée par alignement. Puis, ces séquences ont été comparées à la séquence de référence du clone CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001).

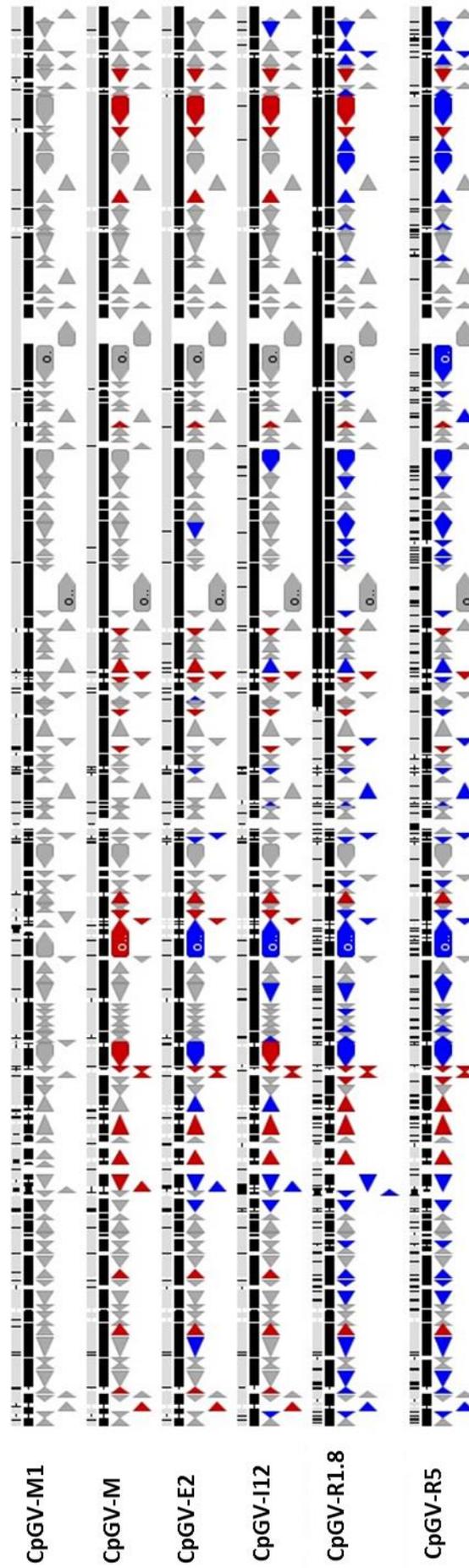
Dans un premier temps, la séquence d'un isolat de CpGV-M de notre stock (2020-s1) a été comparée à la séquence précédemment publiée pour corriger de possibles erreurs de séquençage et obtenir une nouvelle séquence de référence. Les génomes d'isolats viraux ayant des efficacités variables sur carpocapses résistants (CpGV-E2, CpGV-I12, CpGV-R1.8 et CpGV-R5) capables de contourner la résistance du carpocapse à CpGV-M ont ensuite été comparés à notre séquence de l'isolat CpGV-M et à celle de CpGV-M1. Gebhardt *et al.* (2014) ont récemment indiqué qu'une modification au sein du gène *pe38* (ORF 24) était responsable du contournement de la résistance. Une analyse des gènes à sélection positive a donc été conduite dans le but d'évaluer si ce gène, et d'autres, étaient positivement sélectionnés et ainsi ouvrir de nouvelles pistes sur des gènes potentiellement importants pour la fitness du virus.

2. Résultats

2.1. Séquençage complet du génome de 5 isolats viraux et comparaison avec le génome de référence CpGV-M1

Les génomes des isolats CpGV-M, CpGV-E2, CpGV-I12, CpGV-R1.8 et CpGV-R5 ont été entièrement séquencés, assemblés de novo, et comparés à la séquence de référence CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Les ORF ont été nommées en accord avec les annotations présentes sur la séquence de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). L'alignement de ces 5 séquences avec l'isolat de référence est présenté dans la [figure 5.1](#).

Figure 5.1. Carte de l'alignement complet des 5 génomes viraux avec le génome de référence (Luque *et al.*, 2001). Les triangles représentent les ORF : en gris les ORF inchangés, en rouge les ORF de CpGV-M présentant des différences avec CpGV-M1 et en bleu les ORF de CpGV-R1.8 et CpGV-R5 présentant des différences avec CpGV-M1.



2.1.1. Séquençage complet du génome de CpGV-M

La séquence de CpGV-M obtenue a une taille de 123 335 nucléotides (nt). Cette séquence est un peu plus courte que celle de référence (Luque *et al.*, 2001) qui avait une taille de 123 500 nt. Le contenu en G/C de CpGV-M est de 45 % contre 45,27% pour CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). 142 ORF ont été obtenues pour CpGV-M alors que 143 ORF avaient été prédites pour CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001) (Tableau 5.1). Le séquençage de CpGV-M indique des différences dans 27 ORF par rapport à CpGV-M1. Ces différences sont dues à l'insertion ou la délétion d'un nucléotide entraînant un changement de cadre de lecture dans la séquence et à des changements en acides aminés (aa) basés sur des modifications d'un nucléotide (Single Nucléotide Polymorphisms ou SNP). Il est intéressant de noter que la plupart des différences observées entre CpGV-M et CpGV-M1 se trouvent dans des zones répétées du génome.

Des modifications majeures ont été relevées dans les ORF 28, 29, 36, 50, 51, 52, 82, 129 et 130 qui présentent des fusions ou des coupures par rapport à la séquence de référence. Les ORF 28 et 29 sont prédites comme une seule ORF de 456 aa pour CpGV-M. Cette différence est due à l'ajout d'un T en position 23 012. Le décalage de cadre de lecture généré entraîne la disparition du codon stop TGA de l'ORF 28 et l'ORF continue jusqu'au codon stop de l'ORF 29 en position 23 851.

L'ORF 36 est scindée en deux, 36a et 36b mesurant respectivement 55 et 61 aa. Cette modification est due à la délétion d'un G en position 30 984 et à l'insertion d'un A en position 31 060. Ces changements de cadre créent deux ORF qui se chevauchent.

L'ORF 38 trouvée dans CpGV-M1 est absente dans CpGV-M. Cette ORF est couverte par l'ORF 37 ayant une taille de 744 aa contre 683 chez CpGV-M1 .

Les ORF 50 et 51 de CpGV-M1 sont prédites comme une seule ORF de 1101 aa. Cette modification est due à des différences dans une vingtaine de nucléotides entraînant un changement de cadre et donc une disparition du codon stop TAA original de l'ORF 51. Un nouveau codon stop situé 192 nt en aval, allonge donc la protéine potentielle de 64 aa par rapport à CpGV-M1.

L'ORF 52 est prédite comme scindée en deux, 52a et 52b, mesurant respectivement 213 et 121 aa alors que chez CpGV-M1 elle mesurait 342 aa. L'ORF 52a commence 144 nt en amont de l'originale décrite dans CpGV-M1. A cause d'un changement de cadre, l'ORF 52a se termine après 213 aa en position 43 909. L'ORF 52b commence en 48 881, soit 28 aa en

amont du codon stop de l'ORF 52a, pour se terminer à la fin de l'ORF 52 décrite pour CpGV-M1.

L'ORF 82 est elle aussi prédite comme coupée en deux : 82a et 82b, ayant respectivement une taille de 231 et 84 aa. Elles se chevauchent de 76 aa. L'insertion d'un G en position 64 829 chez CpGV-M provoque un changement de cadre, faisant se terminer l'ORF 82b en position 64 401.

Les ORF 129 et 130 présentes chez CpGV-M1 sont fusionnées chez CpGV-M. L'addition d'un G en position 112 699 provoque un changement de cadre supprimant le codon stop et rendant codants les 177 nt présents entre les ORF 129 et 130.

Les ORF 6, 31, 35 et 105 sont plus courtes chez CpGV-M que chez CpGV-M1. Les ORF 26, 27, 37, 55, 76 et 135 sont, par contre, plus longues. Ces modifications sont dues à des modifications de nt, décalant les codons stop.

Des différences d'un nt provoquent un simple changement d'aa ou un changement de cadre pour les ORF 3, 6, 11, 17, 26, 27, 31, 50+51, 55, 73, 83, 87, 125, 131 et 135. Au total, la séquence CpGV-M est similaire à 99,7% à celle de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001).

Tableau 5.1. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-M. Les ORF sont numérotées en fonction des ORF annotées de CpGV-M1 (Luque et al., 2001). Les ORF différentes des ORF prédites pour CpGV-M1 en termes de taille et de séquence d'acides aminés sont écrites en rouge. Les différences sont signalées comme suit : fs = changement de cadre, Δ = délétion, \blacktriangledown = insertion, \curvearrowright remplacement de nt(s) par d'autres, * = modification de nt sans conséquence et par les indications de modifications.

ORF CpGV-M	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-M	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
1	1	granuline	1>747	747	248		
2	2		749<1273	525	174		
3	3	pk-1	1254>2093	840	279	fs 162-180	Δ 1736 (c) ; \curvearrowright 1748 (a->g) ; \blacktriangledown 1792 (t)
4	4		2173<2739	567	188		
5	5		2729>2971	243	80		
6	6		3122>3298	177	58	fs 51-57, Δ 59-72	Δ 3271 (t)
7	7	ie-1	3391<4857	1467	488		
8	8		4963>5541	579	192		
9	9		5581<5886	306	101		
10	10	chitinase	6027<7811	1785	594		
11	11	cathepsine	7934>8935	1002	333	S231C	\curvearrowright 8626-8627 (cg->gc)
12	12		9015-9248	234	77		
12-13							Δ 9255 (g)
13	13	gp37	9318<10073	756	251		
14	14	odv-e18	10146<10400	255	84		
15	15	p49	10401<11774	1374	457		
15-16							\blacktriangledown 12066 (catggtttaattac) , \curvearrowright 12080 (a->g), \blacktriangledown 12140 (c)
16	16		12162<12752	591	196		
17	17	iap-3	12882>13709	828	275	V166A	\curvearrowright 13363 (t->c)
18	18	odv-e56	13747<14814	1068	355		
19	19	orf15R	15188>15415	228	75		
20	20	orf16L	15475<16182	708	235		
21	21	orf17L	16451<16630	180	59		
22	22	orf17R	16853>17896	1044	347		
23	23		17987>18445	459	152		
24	24	pe38	18589<19737	1149	382		
25	25		20183<20347	165	54		
26	26		20346>21107	762	253	Y2F, Δ 60-135, \blacktriangledown 133 aa (121)	\curvearrowright 20335 (a->t), Δ 20510-20733, \blacktriangledown 21239 (t), \blacktriangledown 21240 (t), \blacktriangledown 21256 (a)
27	27		20376<21620	1245	414	C 191 L, Y 197 I, \blacktriangledown 49 aa (365)	\curvearrowright 20335 (a->t), Δ 20734-20510, \blacktriangledown 21239 (t), \blacktriangledown 21240 (t), \blacktriangledown 21256 (a)

ORF CpGV-M	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-M	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
28	28+29		22481>23851	1371	456	fused (fs 73-78)	▼ 22902 (t), ▼ 22934 (c), ▼ 22944 (c), ▼ 22992 (g), ▼ 23012 (t), ▼ 23072 (ccgc), Δ 23078 (g)
30	30		24439>24984	546	181		
30-31							25297 ▼ (c)
31	31	Protéine-F	25116>26909	1794	597	H523Q, Δ 599-601	↻ 26881 (c-> a), ▼ 27090 (t)
32	32		27135>28475	1341	446		
33	33		28547<29431	885	294		
34	34		29474<30163	690	229		
35	35	pif-3	30057>30632	576	191	Δ 192-199	▼ 30814 (g)
36a	36		30808<30972	165	55	fs 36 split	▼ 31060 (a)
36b	36		30711<30893	183	61	split	▼ 31060 (a), Δ 30984 (g)
37	37	odv-e66	31015<33249	2235	744	▼ 1-61	▼ 33020 (t), ▼ 33027 (t), ▼ 33037 (ac), ↻ 33037-33038 (ct->tg), ▼ 33063 (t), ▼ 33353 (a)
-	38						
39	39		33291>33608	318	105		
40	40		33661<33990	330	109		
41	41	lef-2	34131>34646	516	171		
42	42	orf35RA	334738>334986	249	82		
43	43		35033<35377	345	114		
44	44	orf36L	35442<36065	624	207		
45	45		36124<36588	465	154		
46	46	mp-nase	36646<38283	1638	545		
47	47	p13	38290>39099	810	269		
48	48	pif-1	39143>40261	1119	372		
49	49		40258<40647	390	129		
50	50+51		40583>43900	3318	1101	fused	▼ 42942 (tg), ↻ 42943 (g->a), ▼ 42955 (agg), ↻ 42955 (g->a), ▼ 42985 (a); ▼ 43016 (a); ▼ 43028 (g); ▼ 43049 (a); ▼ 43080 (a); ▼ 43116 (ca); ↻ 43116 (c->a); ▼ 43147 (g); ▼ 43173 (g); ↻ 43221 (a->g), Δ 43352 (a), ↻ 43358 (c->a), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52a	52		43909<44649	741	213	▼ 1-33, fs 212 split	▼ 44090 (a)
52b	52		43519<43881	363	121	split	▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52-53							▼ 44727 (t), ▼ 44768 (t)
53	53		44659>44805	147	48		

ORF CpGV-M	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-M	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
54	54	ubiquitine	44881<45165	285	94		
55	55		45244>46308	1065	355	fs269-281 fs307-327 ▼ 327-355	Δ 46220 (t), ▼ 46257 (t), ▼ 46335 (g)
56	56		46315>46524	210	69		
57	57	pp31/39K	46601<47326	726	241		
58	58	lef-11	47277<47681	405	134		
59	59	sod	47636<48034	399	132		
60	60	p74	48408<50474	2067	688		
61	61		50663<50905	213	70		
62	62		50877<51446	570	189		
63	63	bro	51584>51751	168	55		
64	64		52464>53156	693	230		
65	65		53254<53493	240	79		
66	66	ptp-2	53648>53869	222	73		
67	67		53944<54207	264	87		
68	68	p47	54179>55561	1383	460		
69	69		55600>56262	663	220		
69-70							Δ 56489 (a)
70	70		56335<56889	555	184		
71	71	p24capside	56959>57570	612	203		
72	72		57609<57953	345	114		
72-73							▼ 58289 (ata)
73	73	38.7kd	58147<58743	597	198	S72A, I98V, C19W	↻ 58620 (t->c), ↻ 58698 (a->c), ↻ 58855 (a->c)
74	74	lef-1	58724<59431	708	235		
75	75	pif-2	59557>61173	1617	538		
75-76							▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct)
76	76		61332<62012	681	227	▼ 196-227	▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct), ↻ 61590 (t->c)
77	77		62080<62391	312	103		
78	78		62400<62627	228	75		
79	79		62651>63121	471	156		
80	80	lef-6	63118<63423	306	101		
81	81	dbp	63502<64374	873	290		
82a	82		64582<65274	693	231	split	▼ 64829 (g)
82b	82		64401<64658	258	84	split	
83	83	p45	65164>66483	1320	439	fs 53-55	▼ 65485 (a), ↻ 65489 (t->g), Δ 65492 (g)
84	84	p12	66515>66844	330	109		
85	85	bv/odv-c42	66903>68045	1143	380		

ORF CpGV-M	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-M	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
86	86	p6.9	68077>68226	150	49		
87	87	lef-5	68327<69055	729	242	fs 88-91	▼ 68949 (t), Δ 68958 (c), ↻ 69016 (t->c)
88	88	38K	68879>69910	1032	343		
89	89		70078<70563	486	161		
90	90	hélicase	70547>73942	3396	1131		
91	91	odv-e25	74054<74695	642	213		
92	92		74785>75270	486	161		
93	93		75334>76089	756	251		
93-94							↻ 76265 (t->g)
94	94	iap	76133<76864	732	243		
95	95	lef-4	76869<78311	1443	480		
96	96	vp39capside	78383>79240	858	285		
97	97	odv-ec27	79382>80248	867	288		
98	98	ptp-2	80562>81047	486	161		
99	99		81138<82322	1185	394		
100	100		82354>82680	327	108		
101	101	vp91capside	82715<84721	1998	665		
102	102	tip20	84693>85343	651	216		↻ 85099 (c->t)*
103	103		85318>85893	576	191		
104	104	gp41	85919>86788	870	289		
105	105		86868>87128	261	86	Δ 1-25	
106	106	vlf-1	87085>88221	1137	378		
107	107		88317>88571	255	84		
108	108		88683>89129	447	148		
109	109		89224<89799	576	191		
109-110							Δ 90059-90060 (aa)
110	110		90128<90535	408	135		
111	111	dnapol	90655<93810	3156	1051		
112	112	desmoplakine	93752>95908	2157	718		
113	113	lef-3	96119<97180	1062	353		
114	114		97149>97529	381	126		
115	115		97651>98157	507	168		
116	116	iap-5	98339>99166	828	275		
117	117	lef-9	99141>100640	1500	499		
118	118	fp25K	100676>101161	486	161		
119	119		101274>101762	489	162		
120	120	dna-ligase	101813<103525	1713	570		↻ 103322 (g->t)*
121	121		103825>104040	216	71		
122	122		104134>104334	201	66		
123	123	fgf	104424<105626	1203	400		
123-124							Δ 105810 (t)

ORF CpGV-M	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-M	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
124	124		105779>106078	300	99		
125	125	alk-exo	106241>107437	1197	398	H352N	↻ 107460 (c->a)
126	126	hélicase-2	107361>108734	1374	457		
127	127	rr1	108823<110697	1875	624		
128	128	rr2a	110825>111913	1089	362		
129	129+130		111946<112926	981	327	fused	▼ 112699 (g)
131	131	lef-8	113004<115625	2622	873	Q738E	↻ 113579 (g->c)
132	132		115713>116108	396	131		Δ 116273 (g)*
133	133		116170<116358	189	62		
134	134		116348>116749	402	133		
135	135		116818<117948	1131	377	D281N, ▼ 355-377	▼ 117093 (t), ↻ 117273 (c->t)
136	136		117954<118175	222	73		
137	137	lef-10	118126>118395	270	89		
138	138	vp1054	118253>119251	999	332		
139	139		119141<119461	321	106		
140	140		119562>120605	1044	347		
141	141	egt	120688<122142	1455	484		
142	142		122160>122363	204	67		
143	143	me53	122336>123247	912	303		

2.1.2. Séquençage complet du génome de CpGV-E2

Le génome de CpGV-E2, estimé à 123 463 pb est composé de 142 ORF. Le ratio en G/C est de 45%. Toutes les différences trouvées en comparant les séquences de CpGV-M et CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001) sont retrouvées pour CpGV-E2. Ce résultat prouve que les différences obtenues entre CpGV-M et CpGV-M1 correspondaient à des erreurs de séquençage et d'annotations dans CpGV-M1 et non à de réelles différences entre isolats. Au niveau des différences en aa, 12 ORF présentent des modifications absentes sur CpGV-M. Comme dans CpGV-M, l'ORF 38 n'est pas retrouvée. Toutes ces différences sont présentées dans le [tableau 5.2](#).

Les ORF 26 et 27 sont retrouvées plus longues que celles de CpGV-M et CpGV-M1 alors que les ORF 32 et 50+51 sont plus courtes. Comme précédemment, ces modifications sont dues à

des modifications de nt, décalant le codon stop plus tôt ou plus tard dans la séquence. Les modifications majeures constatées ici concernent les ORF 26 et 27 (Tableau 5.2).

Des différences d'un nt provoquent un simple changement d'aa ou un changement de cadre pour les ORF 10, 24, 26, 27, 37, 61, 62, 70, 79, 95. Au total, la similarité du génome de CpGV-E2 avec CpGV-M est de 99,7%. La figure 5.2 confirme cette similarité.

L'ORF 24 correspond au gène *pe38*. Cette ORF est connue pour son rôle dans le contournement de la résistance du carpocapse à l'isolat CpGV-M (Gebhardt *et al.*, 2014). Selon ces auteurs, CpGV-E2 présente une délétion de 24 pb qui n'est pas mise en évidence dans notre séquençage.

Tableau 5.2. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-E2. Les ORF sont numérotées en fonction des ORF annotées de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Les ORF différentes des ORF prédites pour CpGV-M1 en termes de taille et de séquence d'acides aminés sont écrites en rouge. Les différences réelles par rapport à CpGV-M sont écrites en bleu. Les différences sont signalées comme suit : fs = changement de cadre, Δ = délétion, \blacktriangledown = insertion, \cup remplacement de nt(s) par d'autre(s), * = modification de nt sans conséquence et par les indications de modifications.

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
1	1	granuline	1>747	747	248		\cup 564 (t->c)*
2	2		749<1273	525	174		
3	3	pk-1	1254>2093	840	279	fs162-180	Δ 1736 (c); \cup 1748 (a->g); \blacktriangledown 1792 (t)
4	4		2173<2739	567	188		
5	5		2729>2971	243	80		
6	6		3122>3298	177	58	fs51-57, Δ 59-72	Δ 3271 (t)
7	7	ie-1	3391<4857	1467	488		
8	8		4963>5541	579	192		
9	9		5581<5886	306	101		
10	10	chitinase	6027<7811	1785	594	E473D, M555L	\cup 6150 (t->g), \cup 6394 (c->g), \cup 6478(c->t)
11	11	cathepsine	7934>8935	1002	333	S231C	\cup 8626-8627 (cg->gc)
12	12		9015>9248	234	77		
12-13							Δ 9255 (g)
13	13	gp37	9318<10073	756	251		
14	14	odv-e18	10146<10400	255	84		
15	15	p49	10401<11774	1374	457		
15-16							\blacktriangledown 12138 (c)
16	16		12146<12736	591	196		

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
17	17	iap-3	12866>13693	828	275	V166A	↻ 13363 (t->c)
18	18	odv-e56	13731<14798	1068	355		
19	19	orf15R	15172>15399	228	75		
20	20	orf16L	15459<16166	708	235		
21	21	orf17L	16435<16614	180	59		
22	22	orf17R	16837>17880	1044	347		
23	23		17971>18429	459	152		
24	24	pe38	18573<19721	1149	382	V318A, D319N	↻ 18768-18770 (cca->tgt)
25	25		20167<20331	165	54		
26	26		20330>21298	969	322	Δ 31-32, F35I, N40I ↻ 51 (3 I->N), Δ 2I (63-64) -> fs, M72I, ▼ 89-322	Δ 20422-20427 (tcattct), ↻ 20439 (t->a), ↻ 20455 (a->t), Δ 20488-20496 (tcattcatcg), Δ 20515-20520 (tcattca), ↻ 20567 (g->c), ▼ 20631 (t), ▼ 20730 (tcc), ↻ 20738 (g->a), ↻ 20775 (t->a), ↻ 20791 (g->c), ↻ 20799 (g->c),
27	27		20360<21811	1452	483	fs 191-197, A344G, H347D, D352V, ▼ 367 E, fs 402 ▼ 407-483	Δ 20422-20427 (tcattct), ↻ 20439 (t->a), ↻ 20455 (a->t), Δ 20488-20496 (tcattcatcg), Δ 20515-20520 (tcattca), ↻ 20567 (g->c), ▼ 20631 (t), ▼ 20730 (tcc), ↻ 20738 (g->a), ↻ 20775 (t->a), ↻ 20791 (g->c), ↻ 20799 (g->c), ▼ 21239 (t), ▼ 21240 (t), ▼ 21256 (a)
28	28+29		22672>24042	1371	456	fused (fs 73-78)	22902 ▼ (t), 22934 ▼ (c), ▼ 22944 (c), ▼ 22992 (g), ▼ 23012 (t), ▼ 23072 (ccgc), Δ 23078 (g)
28+29-30							↻ 24365 (a->g), ↻ 24371 (t->g), Δ 24492-24508 (aacattttctacgtaat)
30	30		24613>25158	546	181		
30-31							▼ 25297 (c)
31	31	protéine-F	25290>27083	1794	597	H523Q, Δ 599-601	↻ 26881 (c->a), ▼ 27090 (t)
32	32		28625<27309	1317	438	Δ 20-27	Δ 27388-27411 (gagggtttggaggcgcctgaatcgcg)
33	33		28697<29581	885	294		
34	34		29624<30313	690	229		
35	35	pif-3	30207>30782	576	191	Δ 192-199	▼ 30814 (g)
36a	36		30958<31122	165	55	fs 36 split	▼ 31060 (a)
36b	36		30861<31043	183	61	split	Δ 30984 (g), ▼ 31060 (a)
37	37	odv-e66	31165<33399	2235	744	H26Q, L30V, L34V, L37Q, L43V, fs 67-70, ▼ 1-61	▼ 33020 (t), ▼ 33027 (t), ▼ 33037 (ac), ↻ 33037-33038 (ct->tg), ↻ 33151 (g->t), ↻ 33162 (g->c), ↻ 33174 (g->c) ↻ 33184 (g->t), ↻ 33135 (g->c), ▼ 33063 (t), ▼ 33353 (a)

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
-	38						
39	39		33441>33758	318	105		
40	40		33811<34140	330	109		
41	41	lef-2	34281>34796	516	171		
42	42	orf35RA	34888>35136	249	82		
43	43		35183<35527	345	114		
44	44	orf36L	35592<36215	624	207		
45	45		36274<36738	465	154		
46	46	mp-nase	36796<38433	1638	545		
47	47	p13	38440>39249	810	269		
48	48	pif-1	39293>40411	1119	373		
49	49		40408<40797	390	129		
50	50+51		40733>44035	3303	1100	Δ 906 (TQPPV), fused	▼ 42942 (tg), ↻ 42943 (g->a), ▼ 42955 (agg), ↻ 42955 (g->a), ▼ 42985 (a); ▼ 42985 (a); ▼ 43016 (a); ▼ 43028 (g); ▼ 43049 (a); ▼ 43080 (a); ▼ 2nt 43116 (ca); ↻ 43116 (c->a); ▼ 43147 (g); ▼ 43173 (g); ↻ 43221 (a->g), Δ 43352 (a), ↻ 43358 (c->a), Δ 43477-43491 (actcaaccaccagt), ↻ 43759 (c->a), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52a	52		44044<44784	741	213	▼ 1-33, fs 212, split	▼ 44090 (a)
52b	52		43654<44016	363	120	split	▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52-53							▼ 44727 (t), ▼ 44768 (t)
53	53		44794>44940	147	48		
54	54	ubiquitine	45016<45300	285	94		
55	55		45379>46443	1065	355	fs269-281 fs307-327 ▼ 327-355	Δ 46220 (t), ▼ 46257 (t), ▼ 46335 (g)
56	56		46450>46659	210	69		
57	57	pp31/39K	46736<47461	726	241		
58	58	lef-11	47412<47816	405	134		
59	59	sod	47771<48169	399	132		
60	60	p74	48543<50609	2067	688		
60-61							Δ 50676 (a), ↻ 50777 (a->g), ↻ 50784 (a->g), ↻ 50818 (a->g)
61	61		50827<51039	213	70	M24T	↻ 51005 (a->g)
62	62		51011<51580	570	189	H154R, K155V, V156D, Δ 157-158, ▼ 161-162,	▼ 51132 (tcaact), Δ 51143-51148 (atcctt), ↻ 51150 (a->t), ↻ 51152-51158 (tttgggt->aactctg)
63	63	bro	51718>51885	168	55		
64	64		52598>53290	693	230		↻ 53095 (a->g)*

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
65	65		53388<53627	240	79		
66	66	ptp-2	53782>54003	222	73		
67	67		54078<54341	264	87		
68	68	p47	54313>55695	1383	460		
69	69		55734>56396	663	220		
70	70		56470<57024	555	184	V39D	↻ 56948 (a->t)
70-71							Δ 57089-57096 (aataaatc)
71	71	p24capside	57086>57697	612	203		
72	72		57736<58080	345	114		
72-73							▼ 58289 (ata)
73	73	38.7kd	58274<58870	597	198		
74	74	lef-1	58851<59558	708	235		
75	75	pif-2	59684>61300	1617	538		↻ 61026 (t->c)*
75-76							▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct)
76	76		61459<62139	681	226	▼ 196-227	▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct), ↻ 61590 (t->c)
77	77		62207<62518	312	103		
78	78		62527<62754	228	75		
79	79		62778>63248	471	156	M65C	↻ 63009 (t->c)
80	80	lef-6	63245<63550	306	101		↻ 63523 (c->t)*
81	81	dbp	63629<64501	873	290		↻ 63943 (a->c)*
82a	82		64401<64709	693	231	split	▼ 64829 (g)
82b	82		64528<64785	258	85	split	
83	83	p45	65291<66610	1320	439	fs 53-55	▼ 65485 (a), ↻ 65489 (t->g), Δ 65492 (g), ↻ 65690(t->c)*
84	84	p12	66642>66971	330	109		
85	85	bv/odv-c42	67030>68172	1143	380		↻ 67867 (a->g)*
86	86	p6.9	68204>68353	150	49		
87	87	lef-5	68454<69182	729	242	fs 88-91	▼ 68949 (t), Δ 68958 (c), ↻ 69016 (t->c)
88	88	38K	69006>70037	1032	343		
89	89		70205<70690	486	161		
90	90	hélicase	70674>74069	3396	1131		
91	91	odv-e25	74181<74822	642	213		
92	92		74912<75397	486	161		
93	93		75461>76216	756	251		
94	94	iap	76260<76991	732	243		
95	95	lef-4	76996<78438	1443	480	N272S	↻ 77661 (t->c)
96	96	vp39capsid	78510>79367	858	285		
97	97	odv-ec27	79509>80375	867	288		
98	98	ptp-2	80689>81174	486	161		

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
99	99		81265<82449	1185	394		
100	100		82481>82807	327	108		
101	101	vp91capsid	82839<84842	1998	665		
102	102	tip20	84820>85470	651	216		
103	103		85445>86020	576	191		
104	104	gp41	86046>86915	870	289		↻ 86781 (c->g)*
105	105		86995>87255	261	86	Δ 1-25	
106	106	vlf-1	87212>88348	1137	378		
107	107		88444>88698	255	84		
108	108		88810>89256	447	148		
109	109		89351<89926	576	191		
110	110		90257<90664	408	135		
111	111	dnapol	90784>93939	3156	1051		
112	112	desmoplakine	93881>96037	2157	718		
113	113	lef-3	96248<97309	1062	353		
114	114		97278>97658	381	126		
115	115		97780>98286	507	168		
116	116	iap-5	98468>99295	828	275		
117	117	lef-9	99270>100769	1500	499		
118	118	fp25K	100805>101290	486	161		
119	119		101403>101891	489	162		
120	120	dna-ligase	101942<103654	1713	570		↻ 103322 (g->t)*
121	121		103954>104169	216	71		
122	122		104263>104463	201	66		
123	123	fgf	104553<105755	1203	400		
123-124							Δ 105810 (t)
124	124		105908>106207	300	99		
125	125	alk-exo	106370>107566	1197	398	H352N	↻ 107460 (c->a)
126	126	hélicase-2	107490>108863	1374	457		
127	127	rr1	108952<110826	1875	624		
128	128	rr2a	110954>112042	1089	362		
129	129+130		112075<113055	981	326	fused	▼ 112699 (g)
130-131							Δ 115802 (g)
131	131	lef-8	115754>113133	2622	873	Q738E	↻ 113579 (g->c)
132	132		115841>116236	396	131		Δ 116273 (g)*
133	133		116298<116486	189	62		
134	134		116476>116877	402	133		
135	135		116946<118076	1131	376	D281N, ▼ 355-377	▼ 117093 (t), ↻ 117273 (c->t)
136	136		118082<118303	222	73		
137	137	lef-10	118254>118523	270	89		
138	138	vp1054	118381>119379	999	332		

ORF CpGV-E2	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-E2	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
139	139		119269<119589	321	106		
140	140		119690>120733	1044	347		
141	141	egt	120816<122270	1455	484		
142	142		122288>122491	204	67		
143	143	me53	122464>123375	912	303		

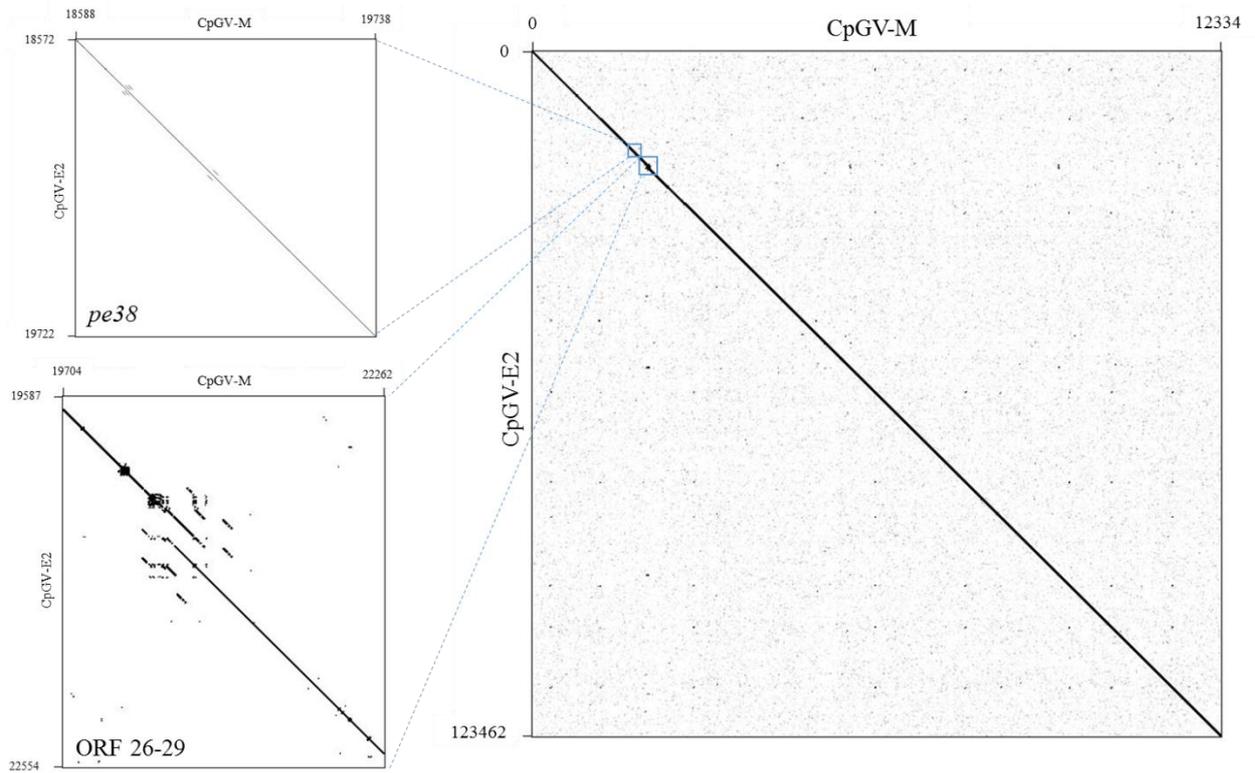


Figure 5.2. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-E2. Un zoom a été pratiqué sur les zones les moins semblables.

2.1.3. Séquençage complet du génome de CpGV-I12

Le génome de CpGV-I12 a été estimé à 123 516 pb et composé de 142 ORF. Le ratio en G/C est de 45,1%. Les différences trouvées en comparant les séquences de CpGV-M et CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001) sont aussi retrouvées pour CpGV-I12. Au niveau des différences en aa,

13 ORF montrent des modifications absentes sur CpGV-M. Comme pour CpGV-M, l'ORF 38 n'est pas retrouvée. Toutes ces différences sont présentées dans le [tableau 5.3](#).

Les ORF 27, 46, 66 et 70 sont plus longues que celles de CpGV-M et CpGV-M1 alors que les ORF 24, 32, 50+51 sont plus courtes. Comme précédemment, ces modifications sont dues à des différences de nt, décalant le codon stop dans la séquence.

Des différences d'un nt provoquent soit un simple changement d'aa soit un changement de cadre de lecture pour les ORF 26, 27, 39, 46, 66, 70, 83, 101 et 141. Au total, la similarité du génome de CpGV-I12 avec celui de CpGV-M est de 99,6%. La [figure 5.3](#) confirme cette similarité.

Les modifications majeures constatées ici sont, comme précédemment, dans les ORF 26, 27 et 70 ([Tableau 5.3](#)).

Une délétion de 24 pb au niveau d'une zone répétée est observée au niveau du gène *pe38*, en accord avec les observations d'Eberle (2009).

Tableau 5.3. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-I12. Les ORF sont numérotées en fonction des ORF annotées de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Les ORF différentes des ORF prédites pour CpGV-M1 en termes de taille et de séquence d'acides aminés sont écrites en rouge. Les différences réelles par rapport à CpGV-M sont écrites en bleu. Les différences sont signalées comme suit : fs = changement de cadre, Δ = délétion, \blacktriangledown = insertion, \cup remplacement de nt(s) par d'autre(s), * = modification de nt sans conséquence et par les indications de modifications.

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
1	1	granuline	1>747	747	248		
2	2		749<1276	528	175	\blacktriangledown 114 G	\blacktriangledown 924 (cca)
3	3	pk-1	1257>2096	840	279	fs 161-180	Δ 1739 (c), \cup 1748 (a->g), \blacktriangledown 1792 (t)
4	4		2176<2742	567	188		
5	5		2732<2974	243	80		
6	6		3125>3301	177	58	fs 51-57, Δ 59-72	Δ 3271 (t), \cup 3288 (g->a)*, \cup 3293 (t->a)*
7	7	ie-1	3393<4859	1467	488		
8	8		4965>5543	579	192		
9	9		5583<5888	306	101		

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
10	10	chitinase	6029<7813	1785	594		
11	11	cathepsine	7936>8937	1002	333	S231C	↻ 8626-8627 (cg->gc)
12	12		9017>9250	234	77		
12-13							Δ 9255 (g)
13	13	gp37	9320<10075	756	251		
14	14	odv-e18	10148<10402	255	84		
15	15	p49	10403<11776	1374	457		
15-16							▼ 12140 (c)
16	16		12148<12738	591	196		↻ 12615 (g->t)*
17	17	iap-3	12868>13695	828	275	V166A	↻ 13363 (t->c)
18	18	odv-e56	13733<14800	1068	355		
18-19							↻ 15020 (a->g)
19	19	orf15R	15174>15401	228	75		
20	20	orf16L	15461<16168	708	235		
21	21	orf17L	16437<16616	180	59		
22	22	orf17R	16839<17882	1044	347		↻ 17186 (c->t)*
23	23		17973<18431	459	152		
24	24	pe38	18575<19699	1125	374	Δ 318-325	↻ 18703 (t->g), Δ 18748-18771 (tgtgtcaccactgtgtcaccac), ↻ 18901 (a->g)
24-25							▼ 20148 (attataatacatTTTTATA)
25	25		20164>20328	165	54		
26	26		20327>21313	987	328	Y2F, I45S, V48D, I49Q, V50H, I53L, I54L, D56Y, I58L, V62H, D67Y, L68P, Q95H, Q99H, fs 101-121, ▼ 121-329	↻ 20335 (a->t); ↻ 20464 (t->g); ↻ 20473 (t->a); ↻ 20475-20476 (at->ca); ↻ 20478-20480 (gtc->cat); ↻ 20487 (a->c); ↻ 20490 (a->c); ↻ 20496 (g->t); ↻ 20502 (a->c); ↻ 20514-20515 (gt->ca); ↻ 20529 (g->t); ↻ 20533 (t->c); ↻ 20615 (g->c); ↻ 20624 (g->t); ↻ 20627 (g->t); ▼ 20630 (t); ↻ 20648 (t->c); ↻ 20679 (g->t); ↻ 20694 (t->a); ↻ 20701 (g->a); ↻ 20708 (t->g); ↻ 20735-20736 (at->ca); ↻ 20738 (g->c); ↻ 20753 (g->t); ↻ 20789 (a->c) ↻ 20820 (c->a); ↻ 20839 (g->c); ↻ 20863 (c->t); ↻ 20873 (t->c); ↻ 20904 (g->t); ↻ 20919 (t->a); ↻ 20926 (g->a); ↻ 20963 (g->c); ↻ 20987 (a->c); ↻ 21005 (g->c); ▼ 21239 (t), ▼ 21240 (t), ▼ 21256 (a)

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
27	27		20357<21826	1470	489	fs 191-197, I281M, D289E, H304L, P309H, I319M, E323K, L327M, L331V, S337I, H347Q, D364E, Y365L, H379L, P384H, I394M, ▼ 405-490	↻ 20464 (t->g); ↻ 20473 (t->a); ↻ 20475-20476 (at->ca); ↻ 20478-20480 (gtc->cat); ↻ 20487 (a->c); ↻ 20490 (a->c); ↻ 20496 (g->t); ↻ 20502 (a->c); ↻ 20514-20515 (gt->ca); ↻ 20529 (g->t); ↻ 20533 (t->c); ↻ 20615 (g->c); ↻ 20624 (g->t); ↻ 20627 (g->t); ▼ 20630 (t); ↻ 20648 (t->c); ↻ 20679 (g->t); ↻ 20694 (t->a); ↻ 20701 (g->a); ↻ 20708 (t->g); ↻ 20735-20736 (at->ca); ↻ 20738 (g->c); ↻ 20753 (g->t); ↻ 20789 (a->c) ↻ 20820 (c->a); ↻ 20839 (g->c); ↻ 20863 (c->t); ↻ 20873 (t->c); ↻ 20904 (g->t); ↻ 20919 (t->a); ↻ 20926 (g->a); ↻ 20963 (g->c); ↻ 20987 (a->c); ↻ 21005 (g->c); ▼ 21239 (t), ▼ 21240 (t), ▼ 21256 (a)
27-28							↻ 22037 (a->c)
28	28+29		22687>24057	1371	456	fused	▼ 22902 (t), ▼ 22934 (c), ▼ 22944 (c), ▼ 22992 (g), ▼ 23012 (t), ▼ 23072 (ccgc) Δ 23078 (g)
29-30							↻ 24343-24344 (ct->aa), ↻ 24347 (a->c); ↻ 24350 (t->a); ↻ 24371 (t->c); ↻ 24416 (c->t); Δ 24492-24508 (aacattttctacgtaat), Δ 24549-24551 (gag)
30	30		24625>25170	546	181		
30-31							▼ 25297 (c)
31	31	protéine-F	25302>27095	1794	597	H523Q, Δ 599-601	↻ 26788 (a->g)*, ↻ 26881 (c->a), ▼ 27090 (t)
32	32		27321>28637	1317	438	Δ 20-27	Δ 27388-27411 (gagggtttggaggcgtgaatgcg)
33	33		28709<29593	885	294		
34	34		29636<30325	690	229		
35	35	pif-3	30219>30794	576	191	Δ 192-199	↻ 30441 (c->t)*, ▼ 30814 (g)
35-36							▼ 30851 (a)
36a	36		30971<31135	165	55	fs 36 split	▼ 31060 (a)
36b	36		30874<31056	183	61	split	Δ 30984 (g), ▼ 31060 (a)
36-37							Δ 31204 (t)
37	37	odv-e66	33411<31177	2235	744	▼ 1-62	▼ 33020 (t), ▼ 33027 (t), ▼ 33037 (ac), ↻ 33037-33038 (ct->tg), ▼ 33063 (t), ▼ 33353 (a)
-	38						

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
39	39		33453>33770	318	105	R71K, N77G	↻ 33691 (g->a), ↻ 33708-33709 (aa->gg)
39-40							▼ 33845 (tattcaat)
40	40		33831<34160	330	109		
41	41	lef-2	34301>34816	516	171		
42	42	orf35RA	34908>35156	249	82		
43	43		35203<35547	345	114		
44	44	orf36L	35612<36235	624	207		
45	45		36294<36758	465	154		
46	46	mp-nase	36816>38456	1641	546	E178D, ▼ 475 G	▼ 37048 (acc), ↻ 37939 (c->a)
47	47	p13	38463>39272	810	269		
48	48	pif-1	39316>40434	1119	372		
49	49		40431<40820	390	129		
50+51	50		40756>44058	3303	1100	Δ 1072-1077, fused	↻ 40882 (c->t), ▼ 42942 (tg), ↻ 42943 (g->a), ▼ 42954 (agg), ↻ 42955 (g->a), ▼ 42985 (a); ▼ 43016 (a); ▼ 43028 (g); ▼ 43049 (a); ▼ 43080 (a); ▼ 43116 (ca); ↻ 43116 (c->a); ▼ 43147 (g); ▼ 43173 (g); ↻ 43221 (a->g), Δ 43352 (a), ↻ 43358 (c->a), Δ 43477-43491 (actcaaccaccagtt), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52a	52		44067<44807	741	246	▼ 1-33, fs 212 split	▼ 44090 (a)
52b	52		43677<44039	363	121	split	▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
53	53		44817>44963	147	48		
54	54	ubiquitine	45039<45323	285	94		
55	55		45402>46466	1065	354	fs269-281 fs307-327 ▼ 327-355	Δ 46220 (t), ▼ 46257 (t), ▼ 46335 (g)
56	56		46473>46682	210	69		
57	57	pp31/39K	46759<47484	726	241		
58	58	lef-11	47435<47839	405	134		
59	59	sod	47794<48192	399	132		
60	60	p74	48566<50632	2067	688		
60-61							↻ 50777 (a->g)
61	61		50851<51063	213	70		
62	62		51035<51604	570	189		
63	63	bro	51742>51909	168	55		
63-64							▼ 52156 (ttta),
64	64		52626>53318	693	230		
65	65		53416<53655	240	79		

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
66	66	ptp-2	53810>54049	240	79	fs 50, ▼ 73-79	Δ 53967-53971 (atttg)
67	67		54101<54364	264	87		
68	68	p47	54336>55718	1383	460		
69	69		55757>56419	663	220		
70	70		56493<57068	576	191	L20I, ▼ S 26, V39D, ▼ 5 aa 40 (EYQSE), ▼ 47 (YQSEDEHYE), Δ 81	↻ 56620 (g->a); Δ 56818-56820 (tga); Δ 56861-56878 (tcggatacatcagagtac), ▼ 56920 (ttcatagtgtcatcctctgattggta), ↻ 56944 (a->g), ▼ 56945 (tctgattggtat), ↻ 56948 (a->t), ▼ 56983 (act), ↻ 57003 (g->t),
71	71	p24capside	57138>57749	612	203		
72	72		57788<58132	345	114		
71-72							▼ 58289 (ata)
73	73	38.7kd	58326<58922	597	198	S72A, I98V, C19W	↻ 58620 (t->c), ↻ 58698 (a->c), ↻ 58855 (a->c)
74	74	lef-1	58903<59610	708	235		
75	75	pif-2	59736>61352	1617	538		
76	76		61511<62191	681	226	▼ 196-227	▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct), ↻ 61590 (t->c)
77	77		62259<62570	312	103		
78	78		62579<62806	228	75		
79	79		62830>63300	471	156		
80	80	lef-6	63297<63602	306	101		
81	81	dbp	63681<64553	873	290		
82a	82		64453<665453	693	231	split	▼ 64829 (g)
82b	82		64580<64837	258	85	split	
83	83	p45	65343>66662	1320	439	Y4C, G20C, fs 53-55	↻ 65338 (a->g), ↻ 65385 (g->t), ▼ 65485 (a), ↻ 65489 (t->g), Δ 65492 (g)
84	84	p12	66694>67023	330	109		
85	85	bv/odv-c42	67082>68224	1143	380		
86	86	p6.9	68256>68405	150	49		
87	87	lef-5	68506<69234	729	242	fs 88-91	▼ 68949 (t), Δ 68958 (c), ↻ 69004 (a->c)*, ↻ 69016 (t->c)
88	88	38K	69058>70089	1032	343		↻ 69312 (t->g)*
89	89		70257<70742	486	161		
90	90	hélicase	70726>74121	3396	1131		↻ 72792 (t->c)*
91	91	odv-e25	74233<74874	642	213		↻ 74449 (t->c)*
91-92							↻ 74907 (a->g)
92	92		74964<75449	486	161		
93	93		75513>76268	756	251		
94	94	iap	76312<77043	732	243		

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
95	95	lef-4	77048<78490	1443	480		↻ 77477 (t->c)*
96	96	vp39capsid	78562>79419	858	285		
97	97	odv-ec27	79561>80427	867	288		
97-98							↻ 80447 (a->g)
98	98	ptp-2	80741>81226	486	161		
99	99		81317<82501	1185	394		
99-100							↻ 82509 (g->t)
100	100		82533>82859	327	108		
101	101	vp91capsid	82894<84891	1998	665	S518N	↻ 83230 (t->c)*, ↻ 83324 (c->t)
102	102	tip20	84872>85522	651	216		↻ 85099 (c->t)*
103	103		85497>86072	576	191		
104	104	gp41	86098>86967	870	289		
105	105		87047>87307	261	86	Δ 1-25	
106	106	vlf-1	87264>88400	1137	378		
107	107		88496>88750	255	84		
108	108		88862>89308	447	148		
109	109		89403<89978	576	191		
110	110		90309<90716	408	135		
111	111	dnapol	90836<93991	3156	1051		
112	112	desmoplakine	93933>96089	2157	718		
113	113	lef-3	96300<97361	1062	353		
114	114		97330>97710	381	126		
115	115		97832>98338	507	168		
116	116	iap-5	98520>99347	828	275		
117	117	lef-9	99322>100821	1500	499		
118	118	fp25K	100857>101342	486	161		
119	119		101455>101943	489	162		
120	120	dna-ligase	101994<103706	1713	570		↻ 103322 (g->t)*
121	121		104006>104221	216	71		
122	122		104315>104515	201	66		
123	123	fgf	104605<105807	1203	400		
123-124							Δ 105810 (t)
124	124		105960>106259	300	99		
125	125	alk-exo	106422>107618	1197	398	H352N	↻ 107460 (c->a)
126	126	hélicase-2	107542>108915	1374	457		
127	127	rr1	109004<110878	1875	624		
128	128	rr2a	111006>112094	1089	362		↻ 111875 (a->g)*
129	129+130		112127<113107	981	326	fused	▼ 112699 (t)
131	131	lef-8	113185<115806	2622	873	Q738E	↻ 113579 (g->c), ↻ 114822 (g->a)

ORF CpGV-I12	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-I12	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
132	132		115894>116289	396	131		Δ 116273 (g)
133	133		116351<116539	189	62		
134	134		116529>116930	402	133		
135	135		116999<118129	1131	376	D281N, ∇ 355-377	∇ 117093 (t), \cup 117273 (c->t)
136	136		118135<118356	222	73		
137	137	lef-10	118307<118576	270	89		
138	138	vp1054	118434>119432	999	332		
139	139		119322<119642	321	106		
140	140		119743>120786	1044	347		\cup 120080 (a->g)*
141	141	egt	120869<122323	1455	484	K285R, A281G	\cup 121454 (t->c), \cup 121466 (g->c), \cup 122149 (a->g)
142	142		122341>122544	204	67		
143	143	me53	122517>123428	912	303		

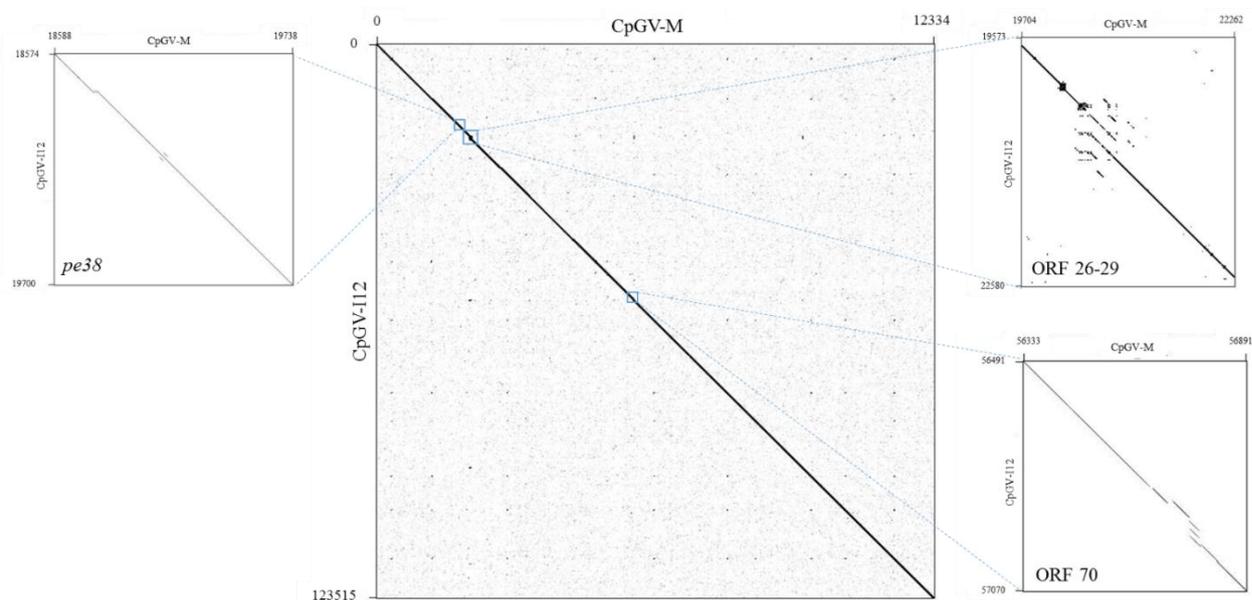


Figure 5.3. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-I12. Un zoom a été pratiqué sur les zones les moins semblables.

2.1.4. Séquençage complet du génome de CpGV-R1.8

CpGV-R1.8 correspond à la 8^{ème} production successive de l'isolat NPP-R1 sur insectes résistants R_{GV}. Le génome de CpGV-R1.8 a été estimé à 123 429 pb et est composé de 142 ORF. Le ratio en G/C est de 45%. Toutes les différences trouvées en comparant les séquences de CpGV-M et CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001) sont retrouvées pour CpGV-R1.8. Au niveau des différences en aa, 50 ORF présentent des modifications absentes sur CpGV-M, ce qui est beaucoup plus important que pour CpGV-E2 et CpGV-I12. Cinq de ces ORF modifiées sont identiques à CpGV-I12 : les ORF 2, 39, 70, 101 et 141. Comme pour CpGV-M, l'ORF 38 n'est pas retrouvée. Toutes ces différences sont présentées dans le [tableau 5.4](#).

Les ORF 16, 27, 46, 52b, 70 et 109 sont plus longues que celles de CpGV-M et CpGV-M1 alors que les ORF 6, 20, 24, 25, 26, 32, 62 et 94 sont plus courtes. Comme précédemment, ces modifications sont dues à des différences de nt, décalant le codon dans la séquence. Il est intéressant de signaler que l'ORF 26 a été massivement réduite passant de 253 aa pour CpGV-M à 25 aa pour CpGV-R1.8, elle a donc presque disparu.

Des différences d'un ou plusieurs nt provoquent soit de simples changements d'aa soit une modification de cadre de lecture pour les ORF 3, 7, 10, 15, 17, 20, 24, 25, 27, 31, 32, 34, 37, 39, 41, 44, 46, 50+51, 57, 61, 62, 66, 68, 70, 74, 82, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 99, 101, 119, 122, 125, 127, 128, 132, 138, 139, 140, 141. Au total, la similarité des génomes de CpGV-R1.8 et de CpGV-M est de 99,3%. La [figure 5.4](#) illustre cette similarité.

Les modifications majeures constatées ici sont, comme précédemment, sur les ORF 26 et 27 mais aussi sur les ORF 25, 50+51 et 70 présentant de fortes différences avec celles de la séquence de CpGV-M ([Tableau 5.4](#)).

Une délétion de 24 pb au niveau d'une zone répétée est observée au niveau du gène *pe38*, en accord avec les observations d'Eberle (2009). Deux substitutions supplémentaires sont également observées (K347G et Q354K) ([Tableau 5.4](#)).

Tableau 5.4. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-R1.8. Les ORF sont numérotées en fonction des ORF annotées de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Les ORF différentes des ORF prédites pour CpGV-M1 en termes de taille et de séquence d'acides aminés sont écrites en rouge. Les différences réelles par rapport à CpGV-M sont écrites en bleu. Les différences sont signalées comme suit : fs = changement de cadre, Δ = délétion, \blacktriangledown = insertion, \circlearrowright remplacement de nt(s) par d'autre(s), * = modification de nt sans conséquence et par les indications de modifications.

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
1	1	granuline	1>747	747	248		\circlearrowright 246 (c->t)*, \circlearrowright 249 (a->c)*, \circlearrowright 564 (t->c)*, \circlearrowright 603 (g->a)*
2	2		749<1276	528	175	\blacktriangledown 114 G	\blacktriangledown 924 (cca)
3	3	pk-1	1257>2096	840	279	R9C, fs 161-180	\circlearrowright 1278 (c->t), Δ 1736 (c), \circlearrowright 1748 (a->g), \blacktriangledown 1792 (t)
3-4							Δ 2135 (a)
4	4		2175<2741	567	188		
5	5		2731>2973	243	80		
6	6		3124>3327	204	67	\blacktriangledown 25-35, fs 51-58, Δ 59-72	\blacktriangledown 3697 (acaagtttaagtactacaaattttac), Δ 3271 (t), \circlearrowright 3288 (g->a), \circlearrowright 3293 (t->a)
7	7	ie-1	3420<4886	1467	488	E367D	\circlearrowright 3602 (t->c), \circlearrowright 3758 (c->a), \circlearrowright 3802 (g->a)
7-8							\circlearrowright 4928 (g->a), \circlearrowright 4953 (a->t)
8	8		4992>5570	579	192		
9	9		5610<5915	306	101		
9-10							Δ 5987 (a)
10	10	chitinase	6055<7839	1785	594	E473D, M555L	\circlearrowright 6150 (t->g), \circlearrowright 6394 (c->g), \circlearrowright 6478 (c->t)*
11	11	cathepsine	7962>8963	1002	333	S231C	\circlearrowright 8626-8627 (cg->gc)
12	12		9043>9276	234	77		
12-13							Δ 9255 (g)
13	13	gp37	9346<10101	756	251		
14	14	odv-e18	10174<10428	255	84		
15	15	p49	10429<11802	1374	457	D30V	\circlearrowright 10834 (g->a)*, \circlearrowright 10931 (a->g)*, \circlearrowright 11688 (t->a)
15-16							\blacktriangledown 12066 (catggttttaagtacg), \circlearrowright 12080 (a->g), \circlearrowright 12118 (a->t), \blacktriangledown 12140 (c)
16	16		12190<12780	630	209	\blacktriangledown 1-13	\blacktriangledown 12752 (t), \circlearrowright 12615 (g->t)*
17	17	iap-3	12911>13738	828	275	A61V, V166A	\circlearrowright 13048 (c->t), \circlearrowright 13363 (t->c)
18	18	odv-e56	13776<14843	1068	355		\circlearrowright 14263 (t->c)*
18-19							\circlearrowright 15020 (a->g), \circlearrowright 15154 (g->c)
19	19	orf15R	15217>15444	228	75		
20	20	orf16L	15504<16202	699	232	G102A, H103Q, A142T, Δ 166-168	Δ 15665-15673 (ttgggataa), \circlearrowright 15744 (c->t), \circlearrowright 15859 (c->a), \circlearrowright 15863 (c->g)

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
21	21	orf17L	16471<16650	180	59		
22	22	orf17R	16873>17916	1044	347		↻ 17186 (c->t)*, ↻ 17734 (c->t)*
23	23		18007<18465	459	152		
24	24	pe38	18609<19733	1125	374	Δ 318-325, K347G, Q354K	↻ 18639 (g->t), ↻ 18660 (t->g), ↻ 18703 (t->g)*, Δ 18748-18771 (tgtgcatccactgtgtcatccac), ↻ 18901 (a->g)*
24-25							↻ 20117 (c->t), ↻ 20137 (a->t), Δ 20148-20151 (atta), ↻ 20153-20154 (aa->t)
25	25		20187<20327	141	46	M40T, Δ 49-54 de M, Δ 19, Δ 21	Δ 20182-20186 (tataa), ↻ 20195 (a->g)*, ↻ 20208 (a->g), Δ 20271-20273 (ctg), Δ 20276-20278 (act), ↻ 20318 (a->t)*
26	26		20326>20403	78	25	fs 13, Δ 27-129	↻ 20623 (a->g), Δ 20367-20371 (ctcat), ↻ 20383-20384 (at->tc), ↻ 20386-20387 (at->ta)
27	27		20324<21850	1527	508	▼ 407-508, V4A, fs 191-196, G317A, E323D, G392A, E398D, fs399 I437D, I438D, V439D, ▼ 454 (IDDEDEDEDE), N465V, N469D, I470E, N492Y, N493D, fs 497	↻ 20363 (a->g), Δ 20367-20371 (ctcat), ↻ 20383-20384 (at->tc), ↻ 20386-20387 (at->ta), ↻ 20451 (a->t), ↻ 20455 (a->t), Δ 20468 (t), ▼ 20469 (tcatcatcatcatgcatca), ▼ 20361 (t), ↻ 20636 (t->g), ↻ 20655 (c->g), ↻ 20861 (t->g), ↻ 20880 (c->g), ▼ 21239 (t), ▼ 21240 (t), ▼ 21256 (a), ↻ 21816 (a->g)
27-28							↻ 22307 (a->c)
28	28+29		22711>24081	1371	456	fs 72-87, fs 103-134, fused	▼ 22902 (t), ▼ 22934 (c), ▼ 22944 (c), ▼ 22992 (g), ▼ 23012 (t), ▼ 23072 (ccgc), Δ 23078 (g),
29-30							Δ 24492-24508 (aacattttctacgtaat), Δ 24536-24551 (acgtaataaaaatgag),
30	30		24636>25181	546	181		↻ 24780 (g->a)*
30-31							↻ 25201 (a->g), ▼ 25215 (atatatatat), ▼ 25297 (c)
31	31		25325>27118	1794	597	G323E, L505I, H523Q, fs 593, Δ 599-601	↻ 25951 (g->a), ↻ 26280 (g->a), ↻ 26590 (g->a), ↻ 26788 (a->g), ↻ 26825 (c->a), ↻ 26881 (c->a), ▼ 27090 (t)
32	32		27344>28660	1317	438	Δ 20-27, L63M, V242A, V256A, M421T	Δ 27388-27411 (gagggttggagcgctgaatgcg), ↻ 27541 (c->a), ↻ 28079 (t->c), ↻ 28121 (t->c), ↻ 28293 (c->t), ↻ 28616 (t->c)
33	33		28732<29616	885	294		↻ 28782 (c->t)*
34	34		29659<30348	690	229	G167A, N130S	↻ 29860 (c->g), ↻ 29971 (t->c), ↻ 29973 (g->a)

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
35	35	pif-3	30242>30817	576	191	Δ 192-199	↻ 30441 (c->t)*, ▼ 30184 (g)
35-36							▼ 30851 (a)
36a	36		30994<31158	165	54	fs 36, split	▼ 31060 (a)
36b	36		30897<31079	183	60	split	▼ 31060 (a), Δ 30984 (g)
36-37							Δ 31204 (t)
37	37	odv-e66	31200<33434	2235	744	▼ 1-61, fs29-143	↻ 31342 (a->g); ▼ 33020 (t); ▼ 33027 (t); ▼ 33037 (ac); ↻ 33037-33038 (ct->tg), ▼ 33099 (gggtgtggagta), Δ 33156-33167 (gggttaggtgga), ↻ 33184 (g->a), ↻ 33212 (t->c), ↻ 33298 (t->c), ▼ 33353 (a),
-	38						
39	39		33476>33793	318	105	R71K, N77G	remp 33691 (g->a), remp 33708-33709 (aa->gg)
39-40							▼ 33845 (tattcaat)
40	40		33854<34183	330	109		
41	41	lef-2	34324<34839	516	171	V48A, F97L	↻ 34462 (t->c), ↻ 34610 (c->a)
42	42	orf35RA	34931>35179	249	82		↻ 35166 (c->a)*
43	43		35570<35226	345	114		↻ 35288 (c->t)*
44	44	orf36L	35635<36258	624	207	I8L	↻ 36233 (t->g)
45	45		36317<36781	465	154		
46	46	mp-nase	36839<38479	1641	546	▼ 476 (G), E178D, V87L	▼ 37048 (acc), ↻ 37717 (a->g), ↻ 37732 (g->a), ↻ 37939 (c->a), ↻ 38214 (c->g),
47	47	p13	38486>39295	810	269		↻ 38946 (a->g)*, ↻ 38985 (t->g)*
48	48	pif-1	39339>40457	1119	372		
49	49		40454<40843	390	129		
50	50+51		40779<44081	3303	1100	fused Y74H, V234A, P486S, ▼ 518 (P), L599F, fs 724	↻ 40882 (c->t), ↻ 40991 (t->c), ↻ 41350 (a->g), ↻ 41472 (t->c), ↻ 41902 (a->g), ↻ 42227 (c->t), Δ 42323-42325 (ccc), ↻ 42569 (c->t), ▼ 42942 (tg), ↻ 42943 (g->a), Δ 42955 (agg), ↻ 42955 (g->a), ▼ 42985 (a), ↻ 43016 (a), ▼ 43028 (g), ↻ 43039 (a->t), ▼ 43049 (a), ↻ 43080 (a), ▼ 43116 (ac), ↻ 43116 (c->), ▼ 43147 (g), ▼ 43173 (g), remp 43195 (g->a), ↻ 43221 (a->g), Δ 43352 (a), ↻ 43358 (c->a), Δ 43477-43491 (actcaaccaccagtt), ▼ 43981 (aga), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52a	52		44090<44830	741	246	split	▼ 44090 (a), ▼ 44727 (t), ▼ 44768 (t)
52b	52		43697<44062	366	121	split, fs 18-101, ▼ L27	▼ 43981 (aga), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a),

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
53	53		44840>44986	147	48		
54	54	ubiquitine	45062<45346	285	94		
55	55		45425>46489	1065	354	fs 269-281, fs 307, ▼ 327-354	Δ 46220 (t), ▼ 46257 (t), ▼ 46335 (g)
56	56		46496>46705	210	69		
57	57	pp31/39K	46782<47507	726	241	A210V, N216D	↻ 46851 (t->c), ↻ 46868 (g->a), ↻ 47077 (a->c)*
58	58	lef-11	47458<47862	405	134		
59	59	sod	47817<48215	399	132		
60	60	p74	48589<50655	2067	688		↻ 49268 (t->c)*
60-61							Δ 50676 (a), ↻ 50777 (a->g), ↻ 50784 (a->g), ↻ 50818 (a->g)
61	61		50873<51085	213	70	M24T	↻ 51005 (a->g)
62	62		51057<51566	510	169	D39Y, Δ 137-158, ▼ 162 (VE)	▼ 51132 (tcaact), Δ 51143-51208 (atccttaactttgtgtgggtcatcaactctgggtcatcaactctgggttcatcaactctgggttc), ↻ 51502 (c->a), ↻ 51834 (t->c)*, ↻ 51840 (a->g)*
63	63	bro	51704>51871	168	55		↻ 51834 (t->c)*, ↻ 51840 (a->g)*
63-64							▼ 52156 (tattttatta),
64	64		52595>53287	693	230		↻ 53095 (a->g)*
65	65		53385<53624	240	79		
65-66							↻ 53702 (t->g)
66	66	ptp-2	53779>54018	240	79	L36M, fs 50	↻ 53923 (c->a), Δ 53967-53971 (attg)
67	67		54070<54333	264	87		
68	68	p47	54305>55687	1383	460	Y24H, V346M	↻ 54399 (c->t), ↻ 54418 (t->c), ↻ 55384 (g->a)
69	69		55726>56388	663	220		
69-70							Δ 56489 (a)
70	70		56461<57036	576	191	L20I, ▼ S 26, V39D, ▼ 40 (EYQSE), ▼ 47 (YQSEDEHYE), Δ 81	↻ 56620 (g->a); Δ 56818-56820 (tga); Δ 56861-56878 (tcggatacatcagagtac), ▼ 56920 (ttcatagtgttcacctctgattggta), ↻ 56944 (a->g), ▼ 56945 (tctgattggtat), ↻ 56948 (a->t), ▼ 56983 (act), ↻ 57003 (g->t),
70-71							Δ 57089-57096 (aataaatc)
71	71	p24capside	57098>57709	612	203		
71-72							↻ 57764 (a->g)
72	72		57748<58092	345	114		
72-73							▼ 58289 (ata)
73	73	38.7kd	58286<58882	597	198	C19W, S72A, I98V	↻ 58620 (t->c), ↻ 58698 (a->c), ↻ 58855 (a->c)
74	74	lef-1	58863<59570	708	235	N28K	↻ 59516 (a->c)
75	75	pif-2	59696>61312	1617	538		↻ 61026 (t->c)*
76	76		61471<62151	681	226	▼ 196-227	▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct), ↻ 61590 (t->c)

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
77	77		62219<62530	312	103		
78	78		62539<62766	228	75		
79	79		62790>63260	471	156		
80	80	lef-6	63257<63562	306	101		↻ 63523 (c->t)*
81	81	dbp	63641<64513	873	290		↻ 63679 (a->g)*, ↻ 63943 (a->c)*
82a	82		64721<65413	693	231	split	▼ 64829 (g)
82b	82		64540<64797	258	85	split	
83	83	p45	65303>66622	1320	439	Y4C, G20C, fs 53-55, I284M	↻ 65338 (a->g), ↻ 65385 (g->t), ▼ 65485 (a), ↻ 65489 (t->g), Δ 65492 (g), ↻ 65571 (t->c), ↻ 65690 (t->c), ↻ 66179 (a->g),
84	84	p12	66654>66983	330	109		
84-85							↻ 67013 (c->t)
85	85	bv/odv-c42	67042>68184	1143	380		↻ 67147 (g->a)*, ↻ 67867 (a->g)*
86	86	p6.9	68216>68365	150	49		
87	87	lef-5	68466<69194	729	242	fs 88-91	↻ 68839 (g->a), ▼ 68949 (t), Δ 68958 (c), ↻ 69004 (a->c), ↻ 69016 (t->c)
88	88	38K	69018>70049	1032	343		↻ 69312 (t->g)*
89	89		70217<70702	486	161	S137P	↻ 70319 (a->g)
90	90	hélicase	70686>74081	3396	1131		↻ 71160 (c->t); ↻ 71310 (a->g); ↻ 71328 (g->a); ↻ 71388 (c->a); ↻ 71499 (c->t); ↻ 71550 (c->t); ↻ 72594 (c->a); ↻ 72633 (t->c); ↻ 72792 (t->c)
91	91	odv-e25	74193<74834	642	213		↻ 74449 (t->c)*
91-92							↻ 74907 (a->g)
92	92		74924<75409	486	161	I111M	↻ 75102 (a->c); ↻ 75165 (c->t)*; ↻ 75186 (t->c)*; ↻ 75381 (g->a)*
93	93		75473>76228	756	251	V145M	↻ 75590 (g->a)*; ↻ 75614 (g->a)*; ↻ 75623 (g->t)*; ↻ 75930 (g->a); ↻ 76190 (a->g)*
93-94							↻ 76265 (t->g)
94	94	iap	76272<76003	684	227	Δ1-25, T9G	↻ 76955 (t->c), ↻ 77026 (c->t)
95	95	lef-4	77008<78450	1443	480	N272S	↻ 77477 (t->c)*, ↻ 77661 (t->c)
96	96	vp39capside	78522>79379	858	285	D90S	↻ 78639 (c->t)*, ↻ 78711 (g->a)*, ↻ 78814-78815 (g->ag)
96-97							↻ 79464(a->g)
97	97	odv-ec27	79521>80387	867	288		
97-98							↻ 80447 (a->g), ↻ 80595 (t->c)
98	98	ptp-2	80701>81186	486	161		
98-99							↻ 81287 (t->c)
99	99		81277<82461	1185	394	A116V	↻ 82140 (g->a)

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
99-100							↻ 82509 (g->t)
100	100		82493>82819	327	108		
100-101							↻ 82847 (t->g)
101	101	vp91capside	82854<84851	1998	665	S518N	↻ 82975 (g->a)*; ↻ 83002 (a->c)* ↻ 83230 (t->c)*; ↻ 83324 (c->t)
102	102	tip20	84832>85482	651	216		
103	103		85457>86032	576	191		
104	104	gp41	86058>86927	870	289		↻ 86781 (c->g)*
105	105		87007>87267	261	86	Δ 1-25	▼ 87004 (a)
106	106	vlf-1	87224>88360	1137	378		
107	107		88456>88710	255	84		
107-108							↻ 88835 (g->c)
108	108		88822>89268	447	148		
109	109		89363<89950	588	195	▼ 10-14	▼ 89937 (acaggatttttc)
109-110							Δ 90054-90067 (aaaaaaaaatcaaaag), ↻ 90139 (t->c)
110	110		90267<90674	408	135		
111	111	dnapol	90794<93949	3156	1051		
112	112	desmoplakine	93891>96047	2157	718		
113	113	lef-3	96258<97319	1062	353		
114	114		97288>97668	381	126		
115	115		97790>98296	507	168		
116	116	iap-5	98478>99305	828	275		
117	117	lef-9	99280>100779	1500	499		↻ 99629 (g->a)*
118	118	fp25K	100815>101300	486	161		
119	119		101413>101901	489	162	A77V	↻ 101668 (c->t), ↻ 101840 (t->c)*
119-120							Δ 101944-101962 (aatacttttaataacta)
120	120	dna-ligase	101933<103645	1713	570		↻ 102254 (a->g)*, ↻ 103274 (g->a)*, ↻ 103322 (g->t)*, ↻ 103565 (a->g)*
120-121							↻ 103768 (t->c), ↻ 103910 (t->a), ↻ 103974 (c->t)
121	121		103945>104160	216	71		
122	122		104254>104454	201	66	V46I	↻ 104434 (g->a)
123	123	fgf	104544<105746	1203	400		↻ 105624 (t->c)*
123-124							Δ 105810 (t), ↻ 105835 (a->c)
124	124		105899>106198	300	99		
125	125	alk-exo	106361>107557	1197	398	K91R ,H352N	↻ 106107 (t->c)*, ↻ 106678 (a->g), ↻ 107460 (c->a)
126	126	hélicase-2	107481>108854	1374	457		
127	127	rr1	108943<110817	1875	624	Y542F	↻ 109239 (t->a), ↻ 109904 (a->g)*, ↻ 110258 (g->a)*
128	128	rr2a	110945>112033	1089	362	E349K	↻ 111875 (a->g)*, ↻

ORF CpGV-R1.8	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R1.8	Taille (nt)	Taille (aa)	Positions et types des différences en aa	Positions et types des différences en nt
							112035 (g->a)
129	129+130		112066<113046	981	326	fs 131, fused	▼ 112699 (g)
131	131	lef-8	113124<115745	2622	873	Q738E	↻ 113579 (g->c), ↻ 114822 (g->a)*
131-132							Δ 115802 (g), ↻ 115803 (g->a)
132	132		115832>116227	396	131	T25N	↻ 115913 (t->c)*, ↻ 115951 (c->a), Δ 116273 (g)
133	133		116289<116477	189	62		
134	134		116467>116868	402	133		↻ 116576 (g->a)*
135	135		116937<118067	1131	376	D281N, ▼ 355-377	▼ 117093 (t), ↻ 117273 (c->t)
136	136		118073<118294	222	73		
137	137	lef-10	118245>118514	270	89		
138	138	vp1054	118372>119370	999	332	V233I	↻ 119114 (g->a)
139	139		119260<119580	321	106	D45G	↻ 119493 (t->c)
140	140		119681>120724	1044	347	D263E, N294D, T331A	↻ 120080 (a->g)*; ↻ 120515 (t->g); ↻ 120606 (a->g); ↻ 120717 (a->g); ↻ 120728 (t->a)*
140-141							Δ 120789-120815 (tattatttagtattgtattgtatatt), ▼ 120836 (aa),
141	141	egt	120782<122236	1455	484	A281G, K285R	↻ 121048 (t->c)*; ↻ 121075 (g->a)*; ↻ 121454 (t->c); ↻ 121466 (g->c)
142	142		122254>122457	204	67		
143	143	me53	122430>123341	912	303		

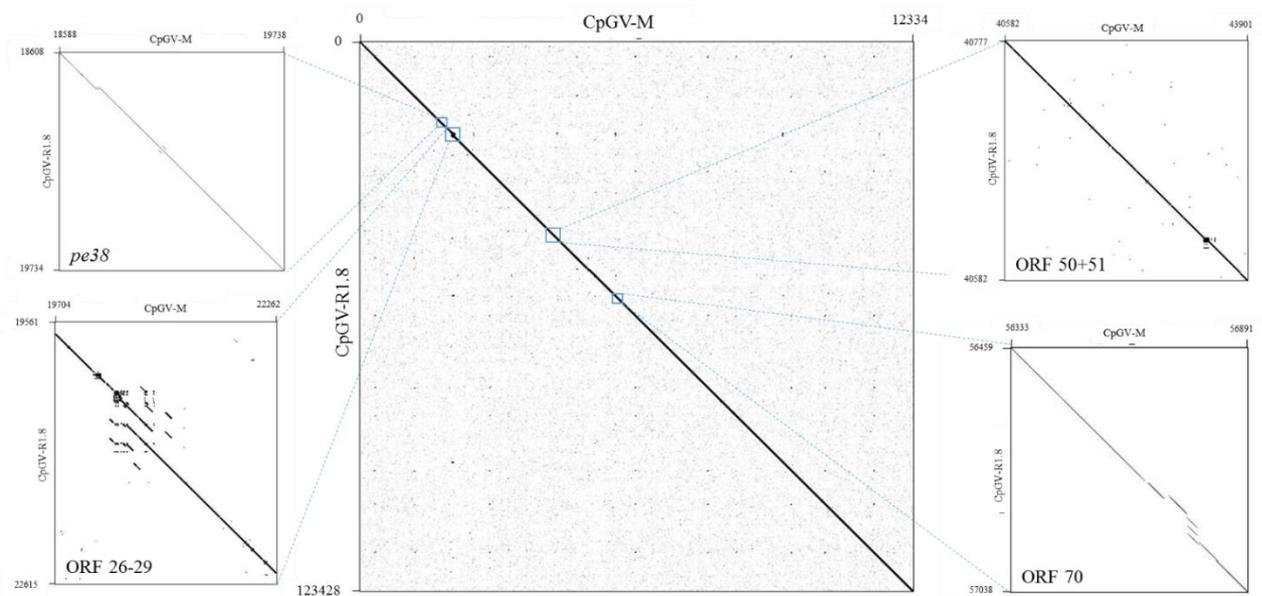


Figure 5.4. Analyse en Dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-R1.8. Un zoom a été pratiqué sur les zones les moins semblables.

2.1.5. Séquençage complet du génome de CpGV-R5

CpGV-R5 correspond au 16^{ème} passage successif de l'isolat NPP-R1 sur insectes résistants R_{GV}. Le génome de CpGV-R5 a été estimé à 123 136 pb et est composé de 142 ORF. Le ratio en G/C est de 44,9%. Toutes les différences trouvées en comparant les séquences de CpGV-M et CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001) sont retrouvées pour CpGV-R5. Au niveau des différences en aa, 56 ORF présentent des modifications absentes sur CpGV-M ce qui est beaucoup plus important que pour CpGV-E2 et CpGV-I12 et beaucoup plus proche de CpGV-R1.8. Quarante-cinq de ces ORF modifiées sont identiques à CpGV-R1.8. Les seules qui diffèrent de CpGV-R1.8 sont les ORF 27, 32, 72, 76, 82b, 94, 106, 108 et 111 ainsi que les ORF 25 et 26 qui ont complètement disparu. En plus de ces deux ORF, l'ORF 38 n'est plus présente comme dans tous les autres génomes séquencés ici. Toutes ces différences sont présentées dans le [tableau 5.5](#). Seules les ORF différentes de CpGV-R1.8 seront ici traitées, les autres ayant déjà été décrites dans le paragraphe précédent.

Les ORF 27 et 32 sont plus longues que celles de CpGV-M et CpGV-M1 alors que les ORF 72 et 94 sont plus courtes. Les ORF 25 et 26 ont, quant à elles, complètement disparu du fait d'une importante délétion de 37 nt (20 455 à 20 492) supprimant le codon start des deux ORF.

Des différences d'un ou plusieurs nt provoquent de simples changements d'aa ou un changement de cadre pour les ORF 27, 72, 76, 82b, 94, 106, 108 et 111. Au total, la similarité du génome de CpGV-R5 par rapport à celui de CpGV-M est de 98,9%. La [figure 5.5](#) illustre cette similarité.

Les modifications majeures constatées ici sont identiques à celles observées sur CpGV-R1.8. La structure du gène *pe38* est, elle aussi, identique à CpGV-R1.8 ([Tableau 5.4 et 5.5](#)).

Tableau 5.5. Positions et orientations des 142 ORF prédites pour CpGV-R5. Les ORF sont numérotées en fonction des ORF annotées de CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Les ORF différentes des ORF prédites pour CpGV-M1 en termes de taille et de séquence d'acides aminés sont écrites en rouge. Les différences réelles par rapport à CpGV-M sont écrites en bleu. Les différences sont signalées comme suit : fs = changement de cadre, Δ = délétion, ∇ = insertion, \cup remplacement de nt(s) par d'autre(s), * = modification de nt sans conséquence et par les indications de modifications.

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
1	1	granuline	1>747	747	248		\cup 246 (c->t)*, \cup 249 (a->c)*, \cup 564 (t->c)*, \cup 603 (g->a)*
2	2		749<1276	528	175	∇ 114 G	∇ 924 (cca)
3	3	pk-1	1257>2096	840	279	R9C, fs 161-180	\cup 1278 (c->t), Δ 1736 (c), \cup 1748 (a->g), ∇ 1792 (t)
3-4							Δ 2135 (a)
4	4		2175<2741	567	188		
5	5		2731>2973	243	80		
6	6		3124>3327	204	67	∇ 25-35, fs 51-58, Δ 59-72	∇ 3697 (acaagttaatgtactacaaattttac), Δ 3271 (t), \cup 3288 (g->a), \cup 3293 (t->a)
7	7	ie-1	3420<4886	1467	488	E367D	\cup 3602 (t->c)*, \cup 3758 (c->a), remp 3802 (g->a)*
7-8							\cup 4928 (g->a), \cup 4953 (a->t)
8	8		4992>5570	579	192		
9	9		5610<5915	306	101		
9-10							Δ 5987 (a)
10	10	chitinase	6055<7839	1785	594	E473D, M555L	\cup 6150 (t->g), \cup 6394 (c->g), \cup 6478 (c->t)*
11	11	cathepsine	7962>8963	1002	333	S231C	\cup 8626-8627 (cg->gc)
12	12		9043>9276	234	77		
12-13							Δ 9255 (g)
13	13	gp37	9346<10101	756	251		

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des differences en aa	Position et type des differences en nt
13-14							▼ 10113 (ttaacaacacacaattaacaacacaa atataacaacacacaattaacaacacaa a)
14	14	odv-e18	10230<10484	255	84		
15	15	p49	10485<11858	1374	457	D30V	↻ 10834 (g->a)*, ↻ 10931 (a->g)*, ↻ 11688 (t->a)
15-16							▼ 12066 (catggttttaagtacg), ↻ 12080 (a->g), ↻ 12118 (a->t), ▼ 12140 (c)
16	16		12246<12836	630	209	▼ 1-13	▼ 12752 (t), ↻ 12615 (g->t)
17	17	iap-3	12967>13794	828	275	A61V, V166A	↻ 13048 (c->t), ↻ 13363 (t->c)
18	18	odv-e56	13832<14899	1068	355		↻ 14263 (t->c)*
18-19							↻ 15020 (a->g), ↻ 15154 (g->c)
19	19		15273>15500	228	75		
20	20	orf16L	15560<16258	699	232	G102A, H103Q, A142T, Δ 166-168	Δ 15665-15673 (ttgggataa), ↻ 15744 (c->t), ↻ 15859 (c->a), ↻ 15863 (c->g)
21	21	orf17L	16527<16706	180	59		
22	22	orf17R	16924>17967	1044	347		↻ 17186 (c->t), ↻ 17734 (c->t)
23	23		18058>18516	459	152		
24	24	pe38	18660<19784	1125	374	Δ 318-325, K347G, Q354K	↻ 18639 (g->t), ↻ 18660 (t->g), ↻ 18703 (t->g)*, Δ 18748-18771 (tgtgtcatccatgtgtcatccac), ↻ 18901 (a->g)*
24-25							↻ 20117 (c->t), ↻ 20137 (a->t), Δ 20148-20151 (atta), ↻ 20153-20154 (aa->tt)
-	25						
-	26						
27	27		20369<21643	1275	424	V4A, fs 191-197, Δ 364-438, ▼ 453, Δ 489-501	Δ 20327-20364 (ggatcatgtatgtatggttcagacagaa tatacactat), ↻ 20451 (a->t), ↻ 20455 (a->t), Δ 20468 (t), ▼ 20468 (ctcatcttcatcttcatcttcatcaat) , Δ 20515-20738 (tcatcatcatcatcgacctcattaatcat ctcccgtccacgggtgtgtcatgttct cagccttgttgggtgtaaggctcactccgc tcaaaccatcagaatgttgcgcagct gtgttttcatccttctgattatgccttttc aaacaaaaagcactcagggtcatgttg tagtggttcagacagaatatacactgtg gcccttcatcatcatag), ▼ 21239 (t), ▼ 21240 (t), ▼ 21256 (a), ↻ 21816 (a->g)
27-28							↻ 22307 (a->c)
28	28+29		22504>23874	1371	456	fs 72-87 , fs 103- 134, fused	▼ 22902 (t), ▼ 22934 (c), ▼ 22944 (c), ▼ 22992 (g), ▼ 23012 (t), ▼ 23072 (ccgc), Δ 23078 (g),
29-30							↻ 24416 (c->t), Δ 24492- 24508 (aacatttctacgtaat), Δ 24536-24551 (acgtaataaaaaatgag),
30	30		24429<24974	546	181		↻ 24780 (g->a)
30-31							↻ 25201 (a->g), ▼ 25215

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
							(atatatatat), ▼ 25297 (c)
31	31	protéine-F	25118<26911	1794	597	G323E, L505I, H523Q, fs 593, Δ 599-601	↻ 25951 (g->a), ↻ 26280 (g->a), ↻ 26590 (g->a), ↻ 26788 (a->g), ↻ 26825 (c->a), ↻ 26881 (c->a), ▼ 27090 (t)
32	32		27137>28480	1344	447	Δ 20-27, L63M, ▼ 120 (9aa), V242A, V256A, M421T	Δ 27388-27411 (gagggttggaggcgtgaatgcg), remp 27541 (c->a), ▼ 27689 (AAACTGAAGAAGAAAT ACAGCAAAATC), ↻ 28079 (t->c), ↻ 28121 (t->c), ↻ 28293 (c->t), ↻ 28616 (t->c)
33	33		28552<29436	885	294		↻ 28782 (c->t)
34	34		29479<30168	690	229	G167A, N130S	↻ 29860 (c->g), ↻ 29971 (t->c), ↻ 29973 (g->a)
35	35	pif-3	30062>30637	576	191	Δ 192-199	↻ 30441 (c->t)*, ▼ 30184 (g)
36a	36		30813<30977	165	54	fs 36, split	▼ 31060 (a)
36b	36		30716<30898	183	60	split	▼ 31060 (a), Δ 30984 (g)
36-37							Δ 31204 (t)
37	37	odv-e66	31019<33253	2235	744	▼ 1-61, fs29-143	↻ 31342 (a->g); ▼ 33020 (t); ▼ 33027 (t); ▼ 33037 (ac); ↻ 33037-33038 (ct->tg), ▼ 33099 (ggtgtggagta), Δ 33156-33167 (ggtgtagggtgga), ↻ 33184 (g->a), ↻ 33212 (t->c), ↻ 33298 (t->c), ▼ 33353 (a),
-	38						
39	39		33476>33793	318	105	R71K, N77G	↻ 33691 (g->a), ↻ 33708-33709 (aa->gg)
39-40							▼ 33845 (tattcaat)
40	40		33673<34002	330	109		
41	41	lef-2	34143>34658	516	171	V48A, F97L	↻ 34462 (t->c), ↻ 34610 (c->a)
42	42	orf35RA	34750>34998	249	82		↻ 35166 (c->a)
43	43		35045<35389	345	114		↻ 35288 (c->t)
44	44	orf36L	35454<36077	624	207	I8L	↻ 36233 (t->g)
45	45		36136<36600	465	154		
46	46	mp-nase	36658<38298	1641	546	▼ 476 (G), E178D, V87L	▼ 37048 (acc), ↻ 37717 (a->g), ↻ 37732 (g->a), ↻ 37939 (c->a), ↻ 38214 (c->g),
47	47	p13	38305>39114	810	269	V212I	↻ 38946 (a->g)*, ↻ 38985 (t->g)*, ↻ 39030 (c->t)*, ↻ 39081 (a->g)*, ↻ 39112 (g->a),
48	48	pif-1	39158>40276	1119	372		
49	49		40273<40662	390	129		

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
50	50+51		40598>43900	3303	1100	fused Y74H, V234A, P486S, ▼ 518 (P), L599F, fs 724	↻ 40882 (c->t), ↻ 40991 (t->c), ↻ 41350 (a->g), ↻ 41472 (t->c), ↻ 41902 (a->g), ↻ 42227 (c->t), Δ 42323-42325 (ccc), remp 42569 (c->t), ▼ 42942 (tg), ↻ 42943 (g->a), Δ 42955 (agg), ↻ 42955 (g->a), ▼ 42985 (a), remp 43016 (a), ▼ 43028 (g), ↻ 43039 (a->t), ▼ 43049 (a), ↻ 43080 (a), ▼ 43116 (ac), ↻ 43116 (c->), ▼ 43147 (g), ▼ 43173 (g), ↻ 43195 (g->a), ↻ 43221 (a->g), Δ 43352 (a), ↻ 43358 (c->a), Δ 43477-43491 (actcaaccaccagtt), ▼ 43981 (aga), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a)
52a	52		43909<44649	741	246	split	▼ 44090 (a), ▼ 44727 (t), ▼ 44768 (t)
52b	52		43516<43881	366	121	split, fs 18-101, ▼ L27	▼ 43981 (aga), ▼ 43986 (a), ▼ 44003 (a),
53	23		44659>44805	147	48		
54	54	ubiquitine	44881<45165	285	94		
55	55		45244>46308	1065	354	fs 269-281, fs 307, ▼ 327-354	Δ 46220 (t), ▼ 46257 (t), ▼ 46335 (g)
56	56		46315>46524	210	69		
57	57	pp31/39K	46601<47326	726	241	A210V, N216D	↻ 46851 (t->c), ↻ 46868 (g->a), ↻ 47077 (a->c)*
58	58	lef-11	47681<47277	405	134		
59	59	sod	47636<48034	399	132		
60	60	p74	48408<50474	2067	688		↻ 49268 (t->c)
60-61							Δ 50676 (a), ↻ 50777 (a->g), ↻ 50784 (a->g), ↻ 50818 (a->g)
61	61		50692<50904	213	70	M24T	↻ 51005 (a->g)
62	62		50876<51385	510	169	D39Y, Δ 137-158, ▼ 162 (VE)	▼ 51132 (tcaact), Δ 51143-51208 (atcctaacttgtgtggttcatcaactctgggttcatcaactctgggttcatcaactctgggttc), ↻ 51502 (c->a),
63	63	bro	51523>51690	168	55		↻ 51834 (t->c), ↻ 51840 (a->g)
63-64							▼ 51992 (atagcgacctaccgaaatacctgcgcaagggtatttacgtgatcgggtgtagta gaaatcgcgtaaaactacacctgtg aattacgctagatcgctgcagacaagc tggactacgtgttcgtatccatgatg ggcaaccataaggcgactatgcaaa aagatgtattgcaatcgctggagtcact accactagagtgacg), ▼ 52156 (tattttatta)
64	64		52626>53318	693	230		↻ 53095 (a->g)
65	65		53416<53655	240	79		
65-66							↻ 53702 (t->g)
66	66	ptp-2	53810>54049	240	79	L36M, fs 50	↻ 53923 (c->a), Δ 53967-53971 (atttg)

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des differences en aa	Position et type des differences en nt
67	67		54101<54364	264	87		
68	68	p47	54336>55718	1383	460	Y24H, V346M	↻ 54399 (c->t), ↻ 54418 (t->c), ↻ 55384 (g->a)
69	69		55757>56419	663	220		
69-70							Δ 56489 (a)
70	70		56492<57067	576	191	L20I, ▼ S 26, V39D, ▼ 40 (EYQSE), ▼ 47 (YQSEDEHYE), Δ 81	↻ 56620 (g->a); Δ 56818-56820 (tga); Δ 56861-56878 (tcggatacatcagagtac), ▼ 56920 (ttcatagtgttcactcctctgattggta), ↻ 56944 (a->g), ▼ 56945 (tctgattggat), ↻ 56948 (a->t), ▼ 56983 (act), ↻ 57003 (g->t),
70-71							Δ 57089-57096 (aataaatc)
71	71	p24capside	57129>57740	612	203		
71-72							↻ 57764 (a->g)
72	72		57868<57975	108	35	fs 21, Δ 35-114	Δ 57914-58061 (atgagttaacaaaatactttatcctaaca aaattgtgattaccgtcccagtagctg ctctttggacatcatctctctataaaatccc agttcaatcatcaataacatactggtagtatctagccgttatcggatcattggta c)
NC 72-73							▼ 58289 (ata)
73	73	38.7kd	58169<58765	597	198	C19W, S72A, I98V	↻ 58620 (t->c), ↻ 58698 (a->c), ↻ 58855 (a->c)
74	74	lef-1	58746<59453	708	235	N28K	↻ 59516 (a->c)
75	75	pif-2	61195<59579	1617	538		
76	76		61354<62034	681	226	D85E, ▼ 196-227	▼ 61547 (c), ▼ 61590 (ct), ↻ 61590 (t->c), ↻ 61923 (a->c)
77	77		62102<62413	312	103		
78	78		62422<62649	228	75		
79	79		62673<63143	471	156		
80	80	lef-6	63140<63445	306	101		↻ 63523 (c->t)
81	81	dbp	63524<64396	873	290		↻ 63679 (a->g), ↻ 63943 (a->c)
82a	82		64604<65296	693	230	split	▼ 64829 (g)
82b	82		64423<64680	258	85	Δ 1-16, G18T, Y34T, A149S, split	↻ 65338 (a->g), ↻ 65385 (g->t)
83	83	p45	65186>66505	1320	439	Y4C, G20C, fs 53-55, I284M	↻ 65338 (a->g), ↻ 65385 (g->t), ▼ 65485 (a), ↻ 65489 (t->g), Δ 65492 (g), ↻ 65571 (t->c), ↻ 65690 (t->c), ↻ 66179 (a->g),
84	84	p12	66537>66866	330	109		
84-85							↻ 67013 (c->t)
85	85	bv/odv-c42	66925<68065	1143	380		↻ 67147 (g->a), ↻ 67867 (a->g)
86	86	p6.9	68099>68248	150	49		
87	87	lef-5	68349<69077	729	242	fs 88-91	↻ 68839 (g->a), ▼ 68949 (t), Δ 68958 (c), remp 69004 (a->c), ↻ 69016 (t->c)

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
88	88	38K	68901>69932	1032	343		↻ 69312 (t->g)
89	89		70100<70585	486	161	S137P	↻ 70319 (a->g)
90	90	hélicase	70569>73964	3396	1131		↻ 71160 (c->t); ↻ 71310 (a->g); ↻ 71328 (g->a); ↻ 71388 (c->a); ↻ 71499 (c->t); ↻ 71550 (c->t); ↻ 72594 (c->a); ↻ 72633 (t->c); ↻ 72792 (t->c)
91	91	odv-e25	74076<74717	642	213		↻ 74449 (t->c)*
91-92							↻ 74907 (a->g)
92	92		74807<75292	486	161	I111M	↻ 75102 (a->c); ↻ 75165 (c->t)*; ↻ 75186 (t->c)*; ↻ 75381 (g->a)*
93	93		75356>76111	756	251	V145M	↻ 75590 (g->a)*; ↻ 75614 (g->a)*; ↻ 75623 (g->t)*; ↻ 75930 (g->a); ↻ 76190 (a->g)*
93-94							↻ 76265 (t->g)
94	94	iap	76381<76662	282	93	Δ1-25, T9G, Δ107-166 +fs	Δ 76532-76707 (ggctgctgttcattaacaacactctgat aaactcatcacttttctcataaccacaaa ttgacaccccatgttgctccaatgatcct tcgccaaggatcatcgccccacctcca atcacaatcgactcaccgcaacaaaa acactcaactgatctcccgtccactgt aaca), ↻ 76955 (t->c), ↻ 77026 (c->t)
95	95	lef-4	76715<78157	1443	480	N272S	↻ 77477 (t->c)*; ↻ 77661 (t->c)
96	96	vp39capside	78229>79086	858	285	D90S	↻ 78639 (c->t)*; ↻ 78711 (g->a)*; ↻ 78814-78815 (ga->ag)
96-97							↻ 79464(a->g)
97	97	odv-ec27	79228>80094	867	288		
NC 97-98							↻ 80447 (a->g), ↻ 80595 (t->c)
98	98	ptp-2	80408>80893	486	161		
98-99							↻ 81287 (t->c)
99	99		80984<82168	1185	394	A116V	↻ 82140 (g->a)
99-100							↻ 82509 (g->t)
100	100		82200>82526	327	108		
100-101							↻ 82847 (t->g)
101	101	vp91capside	82561<84558	1998	665	S518N	↻ 82975 (g->a)*; ↻ 83002 (a->c)* ↻ 83230 (t->c)*; ↻ 83324 (c->t)
102	102	tip20	84539>85189	651	216		
103	103		85164>85739	576	191		
104	104	gp41	85765>86634	870	289		↻ 86781 (c->g)
105	105		86714>86974	261	86	Δ 1-25	▼ 87004 (a)
106	106	vlf-1	86931>88067	1137	378	D160E	↻ 87589 (a->g)*; ↻ 87605 (t->c)*; ↻ 87727 (t->g), ↻ 87267 (c->t)*
107	107		88163>88417	255	84		
107-108							↻ 88835 (g->c)
108	108		88529>88975	447	148	V101A	↻ 89147 (t->c)
109	109		89070<89657	588	195	▼ 10-14	▼ 89937 (acaggattttc)

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
109-110							Δ 90054-90067 (aaaaaaaaatcaag), ↻ 90139 (t->c)
110	110		89974<90381	408	135		
111	111	dnapol	90501<93656	3156	1051	A824T	↻ 91255 (a->g)*, ↻ 91506 (c->t), ↻ 93103 (a->g)*, ↻ 93442 (a->g)*
112	112	desmoplakine	93598>95754	2157	718		
113	113	lef-3	95965<97026	1062	353		
114	114		96995>97375	381	126		
115	115		97497>98223	507	168		
116	116	iap-5	98185>99012	828	275		
117	117	lef-9	98987>100486	1500	499		↻ 99629 (g->a)
118	118	fp25K	100522>101007	486	161		
119	119		101120>101608	489	162	A77V	↻ 101668 (c->t), ↻ 101840 (t->c)*
119-120							Δ 101944-101962 (aatacttttaacta)
120	120	dna-ligase	101640<103352	1713	570		↻ 102254 (a->g), ↻ 103274 (g->a), ↻ 103322 (g->t), ↻ 103565 (a->g)
120-121							↻ 103768 (t->c), ↻ 103910 (t->a), ↻ 103974 (c->t)
121	121		103652>103867	216	71		
122	122		103961>104161	201	66	V46I	↻ 104434 (g->a)
123	123	fgf	104251<105453	1203	400		↻ 105624 (t->c)
123-124							Δ 105810 (t), ↻ 105835 (a->c)
124	124		105606>105905	300	99		
125	125	alk-exo	106068>107264	1197	398	K91R ,H352N	↻ 106107 (t->c)*, ↻ 106678 (a->g), ↻ 107460 (c->a)
126	126	hélicase-2	107188>108561	1374	457		
127	127	rr1	108650<110524	1875	624	Y542F	↻ 109239 (t->a), ↻ 109904 (a->g)*, ↻ 110258 (g->a)*
128	128	rr2a	110652>111740	1089	362	E349K	↻ 111875 (a->g)*, ↻ 112035 (g->a)
129	129+130		111773<112753	981	326	fs 131, fused	▼ 112699 (g)
131	131	lef-8	112831<115452	2622	873	Q738E	↻ 113579 (g->c), ↻ 114822 (g->a)*
131-132							Δ 115802 (g), ↻ 115803 (g->a)
132	132		115539>115934	396	131	T25N	↻ 115913 (t->c)*, ↻ 115951 (c->a), Δ 116273 (g)
133	133		115996<116184	189	62		
134	134		116174>116575	402	133		↻ 116576 (g->a)
135	135		116644<117774	1131	376	D281N, ▼ 355-377	▼ 117093 (t), ↻ 117273 (c->t)
136	136		117780<118001	222	73		
137	137	lef-10	117952>118221	270	89		
138	138	vp1054	118079>119077	999	332	V233I	↻ 119114 (g->a)
139	139		118967<119287	321	106	D45G	↻ 119493 (t->c)

ORF CpGV-R5	ORF CpGV-M1	Nom	Position dans CpGV-R5	Taille (nt)	Taille (aa)	Position et type des différences en aa	Position et type des différences en nt
140	140		119388>120431	1044	347	D263E, N294D, T331A	↻ 120080 (a->g)*; ↻ 120515 (t->g); ↻ 120606 (a->g); ↻ 120717 (a->g); ↻ 120728 (t->a)*
140-141							Δ 120789-120815 (tattatttagtattgtattgtatatt), ▼ 120836 (aa),
141	141	egt	120489<121943	1455	484	A281G, K285R	↻ 121048 (t->c)*; ↻ 121075 (g->a)*; ↻ 121454 (t->c); ↻ 121466 (g->c); ↻ 122149 (a->g)*
142	142		121961>122164	204	67		
143	143	me53	122137>123048	912	303		

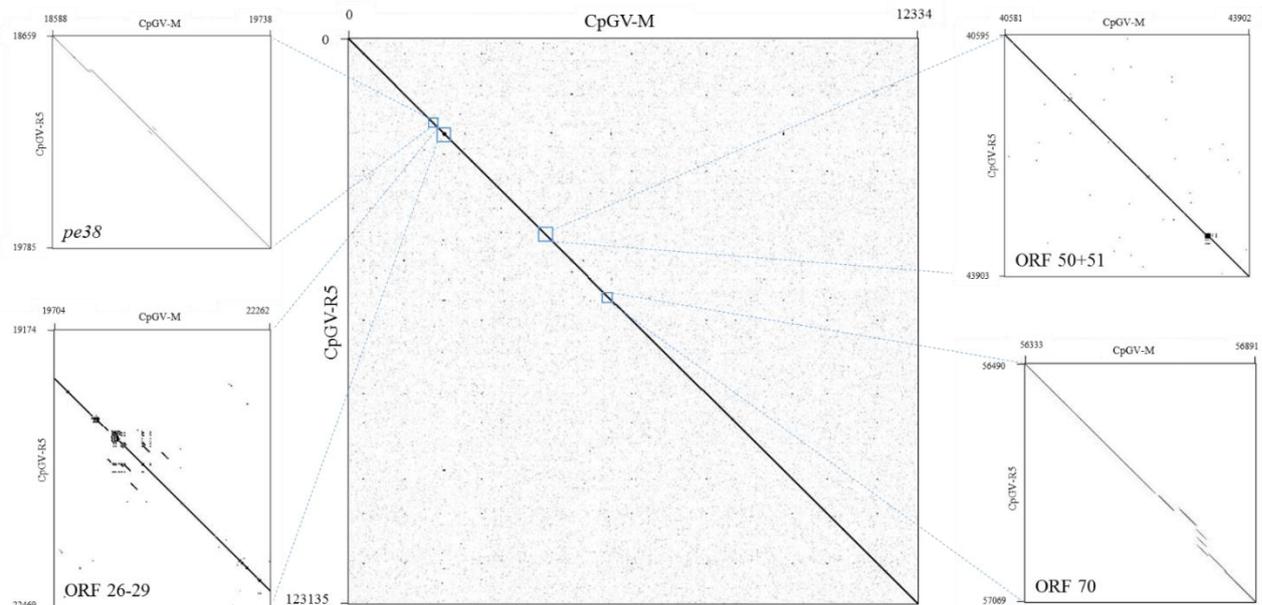


Figure 5.5. Analyse en dot plot du génome complet de CpGV-M et CpGV-R5. Un zoom a été pratiqué sur les zones les moins semblables.

2.2. Analyse des gènes à sélection positive

L'analyse des gènes positivement sélectionnés a été effectuée par le Dr Léopoldo Palma de l'université de Pampelune (Espagne). Une première analyse de la sélection agissant sur chaque ORF a été effectuée en utilisant une méthode par inférence bayésienne sur le serveur Selecton. Cette étude a révélé plusieurs gènes positivement sélectionnés : les ORF 3, 6, 51,

62, 83 et 87. Cette analyse pouvant détecter des faux positifs, de nouvelles études utilisant la méthode du maximum de vraisemblance ont été effectuées avec les logiciels Paml4 et HyPhy. L'ensemble de ces trois études révèle la sélection positive de 4 gènes : l'ORF 3 codant pour le gène *pk-1*, l'ORF 6 codant pour un gène inconnu, l'ORF 83 codant pour le gène *p45* et l'ORF 87 codant pour le gène *lef-5*.

3. Discussion

L'analyse de la séquence obtenue avec notre isolat CpGV-M a révélé des différences avec la séquence de CpGV-M1 publiée par Luque *et al.* (2001). Ces différences sont vraisemblablement des erreurs de séquençages car elles sont aussi retrouvées sur les 4 autres génomes séquencés. Il apparaît donc que les ORF 28 et 29 n'en forment, en réalité, qu'une seule. Il en est de même pour les ORF 50 et 51 ainsi que pour les ORF 129 et 130. Il apparaît aussi que les ORF 36, 52 et 82 sont scindées en deux parties.

L'isolat CpGV-I12 est celui ayant le plus grand génome avec 123 516 pb alors que CpGV-R5 est celui possédant le plus petit génome avec 123 136 pb. Malgré des différences entre certains génomes, il existe une très grande conservation, la plus faible ressemblance étant entre CpGV-M et CpGV-R5 avec une similarité de 98,6%.

Très peu de différences sont observées entre les génomes de CpGV-M et CpGV-E2, excepté pour les ORF 26 et 27 présentant de fortes modifications. Malgré la proximité du génome de CpGV-M avec celui de CpGV-E2, ce dernier semble être capable de contrôler les populations de carpocapses résistants à CpGV-M. Cependant nous n'observons pas la modification de 24 pb sur le gène *pe38* énoncée par Gebhardt *et al.* (2014) chez CpGV-E2, seule une modification de 2 aa est observée.

Les génomes de CpGV-I12, CpGV-R1.8 et CpGV-R5 présentent, par contre, de nombreuses différences par rapport à celui de CpGV-M. Les plus importantes sont situées sur les ORF 26 et 27. Chez CpGV-I12, ces deux ORF sont grandement modifiées mais conservées. Chez CpGV-R1.8, par contre, l'ORF 27 est conservée alors que l'ORF 26 semble disparaître. Cette tendance est confirmée avec la séquence de CpGV-R5, chez qui les ORF 26 et 27 ont complètement disparu. La délétion de 24 nt sur le gène *pe38* est observée sur ces 3 génomes ainsi qu'une modification de 2 aa supplémentaires pour les génomes de CpGV-R1.8 et CpGV-R5.

Il est intéressant de noter que les ORF 26 et 27 n'ont aucun homologue parmi les autres granulovirus et se situent dans des régions répétées (Luque *et al.*, 2001). L'existence d'un produit (protéine) reste à démontrer. Le polymorphisme observé dans ces ORF semble confirmer que cette zone (ORF 25-27) fait partie des régions *hr* du CpGV, comme mis en évidence par Luque *et al.* (2001).

Les gènes positivement sélectionnés sont des gènes pouvant être essentiels ou bien donner un avantage sélectif au virus. L'analyse a révélé 4 gènes de ce type : les ORF 3 (*pk-1*), 6, 83 (*p45*) et 87 (*lef-5*). *pk-1* est impliqué dans la transcription tardive et l'expression très tardive et est essentiel pour les mécanismes d'infection des baculovirus. Ce gène semble aussi associé avec le complexe de transcription très tardive et impliqué dans la phosphorylation de *lef-8* (Mishra *et al.*, 2008). *p45* apparaît comme essentiel pour les baculovirus, sa délétion étant létale (Rohrmann, 2013). La délétion de *lef-5* est aussi létale pour le virus, cette protéine étant un facteur d'initiation (Rohrmann, 2013). Aucune fonction n'est connue pour l'ORF 6.

Il est intéressant ici de noter que le gène *pe38* n'a pas été reconnu comme positivement sélectionné, ce qui semble indiquer qu'il n'apporte pas un avantage sélectif. Pourtant, si comme indiqué par Gebhardt *et al.* (2014), une mutation sur ce gène est à elle seule responsable du contournement de la résistance, on pourrait s'attendre à ce que ce gène soit indispensable au virus pour l'infection d'individus résistants et soit positivement sélectionné. Ce n'est pas le cas alors que d'autres gènes sont, quant à eux, positivement sélectionnés.

4. Conclusion

L'analyse des génomes des cinq isolats de CpGV a révélé une diversité génétique importante entre isolats. Les modifications sur le gène *pe38* récemment publiées et responsables du contournement de résistance par le virus ont été observées sur les génomes de CpGV-I12, CpGV-R1.8 et CpGV-R5, mais pas sur CpGV-E2. Malgré cela, nos résultats ne révèlent pas de sélection positive pour ce gène.

En reliant ces données d'absence de sélection positive du gène *pe38* avec l'absence de coût pour le virus mise en évidence dans le [chapitre 4](#), il paraît difficile de conclure que ce gène est l'unique responsable du contournement de la résistance. Si la modification de ce gène en était complètement responsable, et s'il y avait un coût sélectif pour l'un ou l'autre des allèles (type M ou type R5), il serait sélectionné dans tous les génomes de CpGV. Or, ce n'est pas du tout

ce qui est observé dans les populations naturelles, où des génotypes ne présentant pas cette délétion, comme celui de CpGV-M, sont rencontrés. Des voies alternatives, sans différences de coût, seraient donc disponibles pour le virus lors de la colonisation d'un hôte. La diversification que cela entraînerait augmenterait la difficulté pour cet hôte à devenir résistant à tous les génotypes viraux.

De nouvelles analyses seront requises pour comprendre l'importance d'une telle diversité au sein des populations naturelles de CpGV et évaluer si le gène *pe38* est le seul impliqué dans ce mécanisme de contournement de la résistance ou si d'autres gènes le sont également.

Une explication possible à la détection d'une diversité très importante chez le CpGV pourrait être la présence d'une multitude de stratégies virales pour contourner les différences de permissivité des hôtes. Ainsi, il serait possible pour le virus de contourner des phénomènes de résistance en privilégiant une nouvelle voie pour infecter son hôte. De telles modifications permettraient au virus de perdurer dans la nature sans avoir recours à des modifications drastiques de génome pour suivre l'évolution de son hôte et donc à moindre coût biologique. De nouvelles analyses seront requises comme des travaux de séquençages massifs comme déjà effectué sur AcMNPV (Chateigner, 2014) pour comprendre l'ampleur de la diversité des populations de CpGV. La seule obligation pour le virus est de conserver une large diversité de génotypes viraux dans le but d'infecter une vaste diversité d'hôtes.

Chapitre 6. Adaptation du CpGV à la tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) par évolution dirigée

Ce travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet et fera l'objet d'une publication : **Grillot, B., Besse, S., Blachère-Lopez, C., Siegwart, M. & Lopez-Ferber, M.** Host range extension of CpGV : adaptation to Oriental Fruit Moth, *Cydia molesta*.

1. Introduction

La tordeuse orientale du pêcher (*Cydia molesta*) est l'un des principaux ravageurs des rosacées et en particulier des pêchers. Toutefois, il s'attaque aussi aux pommiers, poiriers, cognassiers, abricotiers et pruniers (Figure 6.1). Ce ravageur est répandu en Europe (France, Espagne, Italie, Russie), en Asie (Chine, Japon), en Amérique du Nord et du Sud et en Afrique du Sud (Figure 6.2). Les dégâts causés par les chenilles sont d'abord situés sur les pousses, forage de galeries provoquant le repli en crosse et le dessèchement, puis sur les fruits, création de galeries les rendant impropres à la consommation.



Figure 6.1. Illustration de la tordeuse orientale du pêcher *Cydia molesta*. (A) Larve attaquant une pousse de pêcher (B) Dégâts provoqués par une larve dans une pêche (C) Individu adulte.

Photos INRA (<http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/3cydmol.htm>)

Ces ravages ont des impacts économiques lourds pouvant aller jusqu'à une perte de plus de 45% de la récolte. La lutte chimique est utilisée contre ce ravageur mais elle est limitée car, en plus d'avoir un effet néfaste sur l'environnement et les insectes auxiliaires, ce moyen de contrôle est de moins en moins efficace et des cas de résistances à diverses molécules chimiques ont été détectés (Pree *et al.* 1998, Kanga *et al.* 2003 ; Siegwart *et al.*, 2011).

Une alternative aux pesticides chimiques est l'utilisation de phéromones pour la confusion sexuelle (Wright, 1965). Elle consiste en la pose de diffuseurs de phéromones dans les vergers avant les premiers vols pour empêcher l'accouplement des papillons. Cette méthode est cependant coûteuse et nécessite un contrôle régulier des parcelles pour être efficace. Sur des zones où la pression du ravageur est importante, les résultats n'atteignent pas les attentes, certains mâles arrivant à s'accoupler (Cardé & Minks, 1995). Enfin, dans la grande majorité des cas, l'utilisation de la confusion sexuelle est accompagnée par plusieurs (jusqu'à 6) traitements par an positionnés surtout en fin de saison lorsque la pression parasitaire est très forte (Siegwart, M. Communication personnelle).

En complément, ou comme alternative aux méthodes biologiques existantes (confusion sexuelle, utilisation de prédateurs ou parasites), le développement d'un agent de biocontrôle d'origine virale est un enjeu économique important. Faute d'avoir isolé un virus à partir de larves de *C. molesta*, l'adaptation d'un virus provenant d'une espèce proche a été tentée.

Cette stratégie a déjà été appliquée pour combattre le ravageur de la pomme de terre *Tecia solanivora* pour lequel aucun isolat viral n'était disponible. *T. solanivora*, la teigne du Guatemala, a été introduite en Amérique du Sud en 1985 via le Venezuela, pour progressivement s'étendre vers le Sud (Colombie en 1991, Equateur en 1996, ...). Dans ces pays, il n'y avait pas la cohorte de pathogènes ou prédateurs pouvant contrôler ce nouvel insecte, qui a progressivement pris la place de la teigne locale de la pomme de terre *Phthorimaea operculella*. Les deux insectes sont proches du point de vue phylogénétique. Un granulovirus pathogène pour *P. operculella* est connu, le *Phthorimaea operculella granulovirus*, PhopGV, et son utilisation en tant qu'agent de biocontrôle est préconisée par le Centre International de la Pomme de Terre (CIP) pour le contrôle de *P. operculella*. Il a été suggéré de l'utiliser également pour le contrôle de *T. solanivora*. Des études avaient montré la capacité d'isolats de ce virus à infecter des hôtes alternatifs mais l'efficacité était trop faible pour en faire un bioinsecticide (Pollet *et al.*, 2003; Rebaudo *et al.*, 2006). La prospection dans des populations de *T. solanivora* en Colombie, quelques années après l'arrivée du ravageur, a

permis de trouver plusieurs isolats viraux. Après analyse, ces isolats se sont révélés génétiquement très proches de ceux connus de PhopGV. Vraisemblablement, la présence de ce nouvel hôte a permis de sélectionner, parmi les génotypes viraux de PhopGV présents sur le terrain, certains, qui, progressivement, se sont adaptés à ce nouvel hôte, permettant un niveau de contrôle satisfaisant dans les tests en laboratoire ou en parcelles expérimentales. Le produit formulé était capable de contrôler efficacement les larves de *T. solanivora* dans les entrepôts de pomme de terre (Villamizar *et al.*, 2008a). Cet isolat est appelé #Col 6. Il a été montré que ces virus pouvaient être utilisés en combinaison avec les insecticides chimiques dans une vision de lutte intégrée (Espinel *et al.*, 2009).

L'isolat CpGV-M a été testé sur d'autres espèces d'insectes phylogénétiquement proches, et notamment la tordeuse orientale, *Cydia molesta* (= *Grapholita molesta*) (Huber, 1978). Lacey *et al* (2005) ont fait une analyse comparée de l'activité de CpGV-M sur ces deux insectes en laboratoire sur des larves néonates. Ils ont constaté que la tordeuse orientale était 557 et 589 fois moins sensible au CpGV-M que le carpocapse des pommes, mesuré par les concentrations létales 50 et 95, respectivement. Pour leur part, Kraaz *et al.* (2011) indiquent une CL₅₀ de 130190 OB/g de milieu nutritif pour l'isolat CpGV-M sur *C. molesta*, contre 1058 OB/g de milieu pour *C. pomonella*. Il est possible que les différences observées soient dues aux méthodes de réalisation des tests biologiques.

Riesgo a *Grapholita (Cydia) molesta* y su distribución mundial

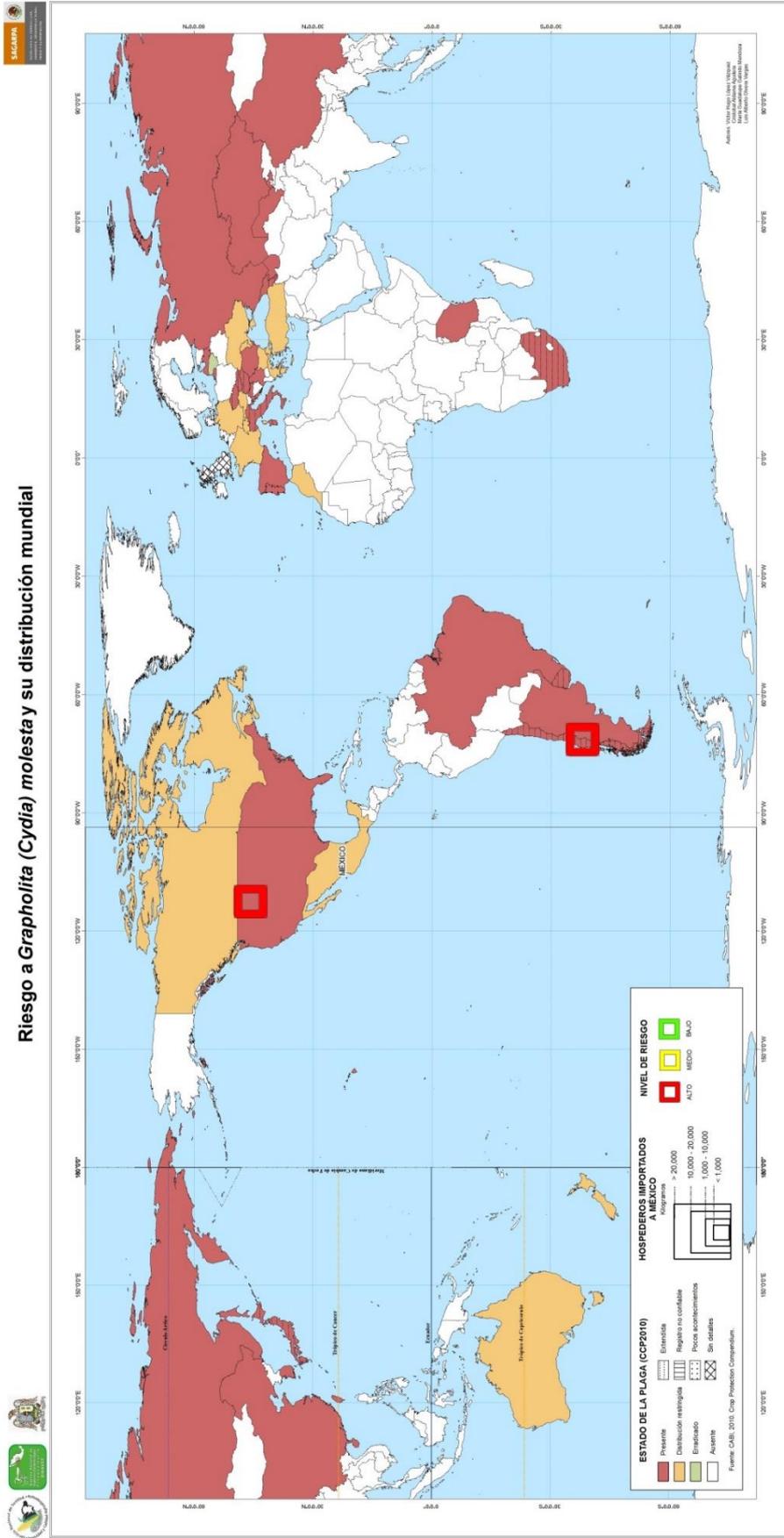


Figure 6.2. Répartition géographique de la tordeuse orientale du pêcheur (*Cydia molesta*) en 2010. Les couleurs représentent le niveau d'infestation, de blanc (ravageur absent) à rouge (ravageur présent). Les carrés de couleurs représentent les risques d'infestation.

Bonhomme *et al.* (2011) indiquent un niveau de protection important contre la tordeuse orientale en verger par l'isolat CpGV-M, sur des essais conduits entre 2004 et 2011. En 2005, sur une parcelle de pêchers, une diminution des dégâts proche de 20% par rapport aux témoins non traités a été décrite. Ces résultats ont conduit à l'extension de l'homologation de la CarpovirusineTM 2000 en France, dont la matière active est le CpGV-M, pour le contrôle de *C. molesta*. Kraaz *et al.* (2011) font part de l'obtention d'un isolat viral de CpGV par sélection en laboratoire (isolat ABC V22). Ils obtiennent une amélioration de l'efficacité de 45 fois, comparée à celle du CpGV-M sur une colonie de *Cydia molesta*, sans perte d'efficacité sur *C. pomonella*. Ils n'indiquent pas le procédé d'obtention.

Un mélange d'isolats viraux (CpGV-M, E2, I12 et R1) a été réalisé et produit pendant 14 générations sur tordeuse orientale. Des tests d'efficacité ont été effectués toutes les 3 générations pour vérifier l'adaptation de ce mélange à la tordeuse orientale. Le 12^{ème} passage a été produit sur la colonie de carpocapse des pommes CpNPP, sensible au CpGV-M, pour vérifier si le nouveau virus obtenu était amplifiable sur l'insecte de référence utilisé en production industrielle. Des profils de restriction utilisant les enzymes *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* et *SalI* ont été effectués après le 12^{ème} passage sur *C. molesta* et ce même passage produit sur CpNPP. Ces profils sont comparés à ceux de CpGV-M et CpGV-R5. Une dernière analyse utilisant les primers permettant de discriminer CpGV-M et CpGV-R5 sur le gène *pe38* a été effectuée. Le plan de ces expérimentations est représenté en [figure 6.3](#).

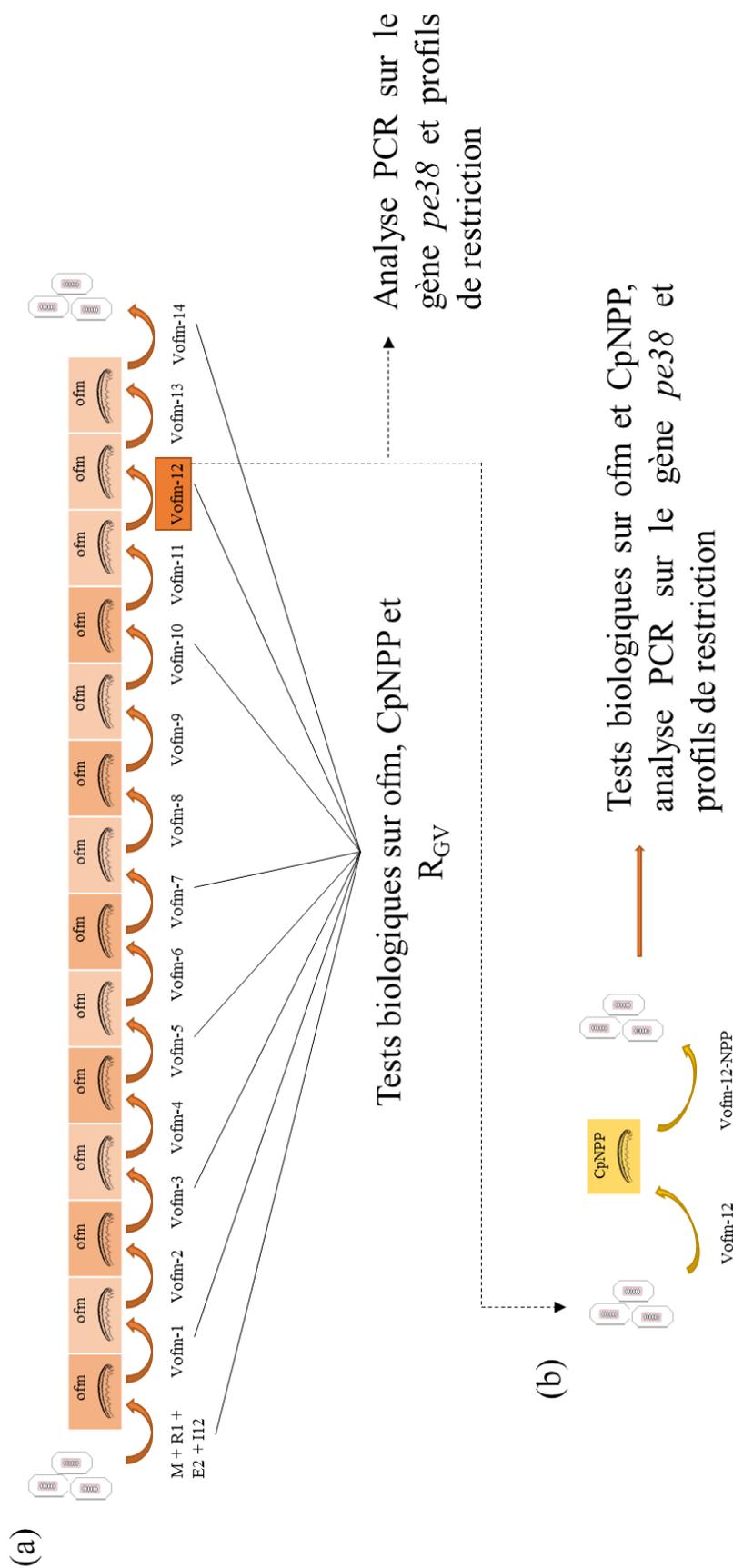


Figure 6.3. Plan d'expérience du chapitre 6 (a) Production successive du mélange d'isolat M-R1-E2-I12 pendant 14 générations sur tordeuse orientale (*ofm*) (b) Production de l'isolat Vofm-12 sur CpNPP, hôte d'origine du CpGV. Les tests biologiques ont été effectués sur larves néonates de tordeuses orientales et de carpacaps sensibles CpNPP et résistantes R_{GV}.

2. Résultats

2.1. Tests d'efficacité des isolats viraux résultant des passages successifs sur tordeuse orientale (TO)

L'efficacité sur tordeuse orientale (CL₅₀ et CL₉₀) du mélange de base et des productions virales issues des différents passages sur larves de TO (Vofm) a été déterminée par une analyse probit. Ces résultats sont présentés dans le [tableau 6.1](#) et la [figure 6.4](#).

Tableau 6.1. Efficacité sur TO des productions virales issues des passages successifs du mélange d'isolats sur TO.

Isolat viral	Nbre d'insectes testés	Nbre d'OBs/μL (95% IC)				Pente ± ES	χ ²
		CL ₅₀	PR	CL ₉₀	PR		
Mix M-R1-E2-I12	371	3,96 × 10 ³ (208-3,28 × 10 ³)	0	2,70 × 10 ⁵ (3,26 × 10 ⁴ -7,16 × 10 ⁵)	0	0,70 ± 0,08	17,56
Vofm-1	373	8,40 × 10 ³ (4,58 × 10 ³ -1,42 × 10 ⁴)	0,48 (0,21-1,09)	1,22 × 10 ⁵ (6,38 × 10 ⁴ -3,15 × 10 ⁵)	2,21 (0,6-8,15)	1,10 ± 0,15	1,65
Vofm-3	372	1,22 × 10 ⁴ (7,15 × 10 ³ -1,92 × 10 ⁴)	0,36 (0,17-0,8)	9,28 × 10 ⁴ (5,35 × 10 ⁴ -2,23 × 10 ⁵)	2,77 (0,78-9,84)	1,46 ± 0,23	1,7
Vofm-5	467	2,72 × 10 ³ (1,66 × 10 ³ -4,19 × 10 ³)	1,46 (0,67-3,19)	2,92 × 10 ⁴ (1,67 × 10 ⁴ -6,65 × 10 ⁴)	9,25 (2,66-32,15)	1,24 ± 0,16	0,78
Vofm-7	278	2,29 × 10 ³ (303,29-9,14 × 10 ³)	1,72 (0,75-3,91)	2,60 × 10 ⁴ (6,90 × 10 ³ -1,06 × 10 ⁴)	10,38 (2,95-36,63)	1,22 ± 0,15	7,41
Vofm-10	424	528,35 (332,02-786,37)	7,51 (3,54-15,93)	3,23 × 10 ³ (1,99 × 10 ³ -6,88 × 10 ³)	83,34 (24,96-278,27)	1,63 ± 0,24	1,35
Vofm-12	308	73,28 (46,37-114,88)	54,05 (24,69-118,34)	601,44 (339,15-1,40 × 10 ³)	448,39 (127,69-1,57 × 10 ³)	1,40 ± 0,18	0,96
Vofm-14	550	218,55 (112,55-434,58)	18,12 (7,239-45,37)	2,40 × 10 ³ (1,05 × 10 ³ -9,40 × 10 ³)	112,54 (25,82-490,56)	1,23 ± 0,20	2,31

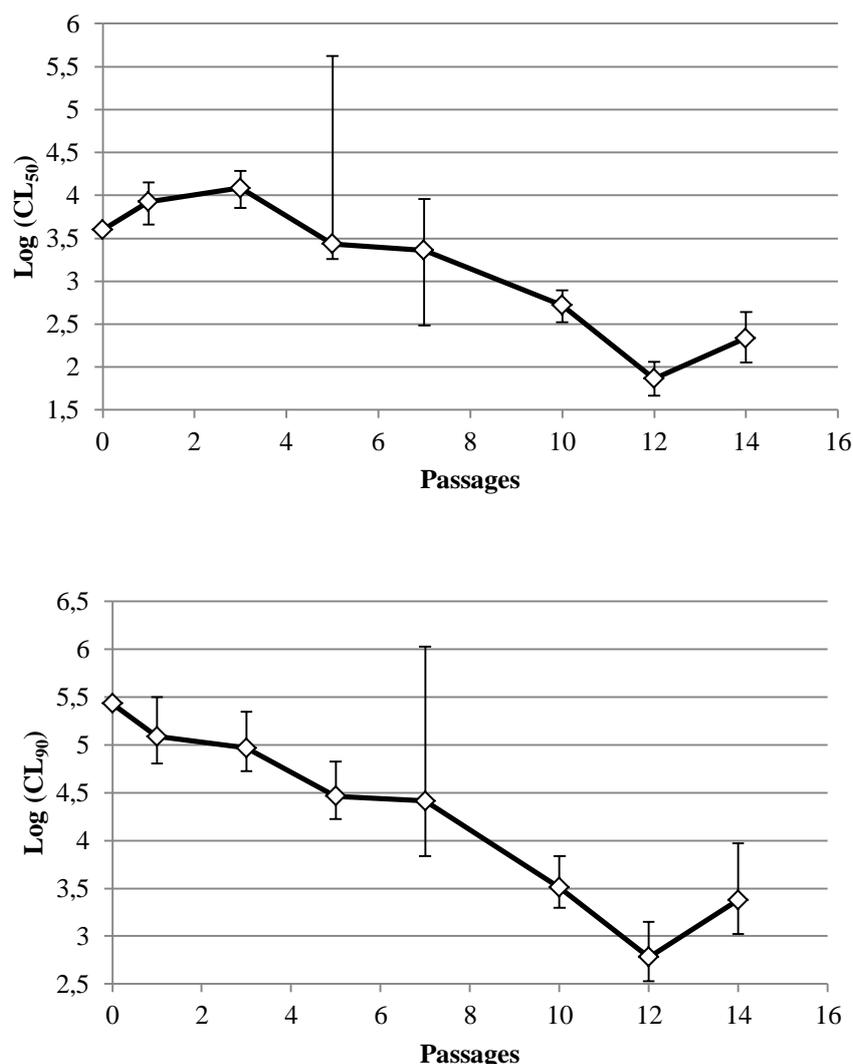


Figure 6.4. Efficacité sur TO des productions virales issues des passages successifs du mélange viral produit sur TO.

Une forte augmentation de l'efficacité a été observée entre le mélange d'isolats et le virus issu du premier passage (Vofm-1) pour la CL₉₀ (Mélange M-R1-E2-I12 : $2,70 \times 10^5$ ($3,26 \times 10^4$ - $7,16 \times 10^8$); Vofm-1 : $1,22 \times 10^5$ ($6,38 \times 10^4$ - $3,15 \times 10^5$)). Chacun des passages suivants apporte un gain substantiel d'efficacité. Pour la CL₅₀, l'amélioration d'efficacité n'est flagrante qu'à partir du 10^{ème} passage. La meilleure efficacité est obtenue avec le passage 12 (Vofm-12 : CL₅₀ : 73,28 (46,37 - 114,88) CL₉₀ : 601,44 (339,15 - $1,40 \times 10^3$), indiquant une adaptation du mélange viral au nouvel hôte. Le passage 14 est un peu moins performant (Vofm-14 : LC₅₀ : 218,55 (112,55 - 434,58) LC₉₀ $2,40 \times 10^3$ ($1,05 \times 10^3$ - $9,40 \times 10^3$), indiquant une possible stabilisation d'efficacité du virus sur TO. Le virus Vofm-12 est donc capable de contrôler efficacement une population de laboratoire de tordeuse orientale.

2.2. Tests d'efficacité des productions virales issues des passages successifs issus de TO sur une colonie sensible de carpocapse du pommier

Des tests d'efficacité ont été effectués avec les virus produits sur TO sur la colonie de carpocapse du pommier sensible à CpGV-M, CpNPP, pour vérifier si ces productions ne perdent pas d'efficacité sur leur hôte d'origine. Ces résultats sont présentés dans le [tableau 6.2](#) et la [figure 6.5](#).

Tableau 6.2. Efficacité sur CpNPP des productions virales issues de passages successifs du mélange viral produit sur TO.

Isolat viral	Nbre d'insectes testés	Nbre d'OBS/μL (95% IC)				Pente ± ES	χ ²
		CL ₅₀	PR	CL ₉₀	PR		
Mix M-R1-E2-I12	553	15,79 (7,78-32,92)	0	103,2 (46-527,52)	0	1,57 ± 0,15	10,29
Vofm-1	555	36,75 (11,92-132,14)	0,43 (0,29-0,64)	168,26 (62,53-5,66 × 10 ³)	0,61 (0,33-1,14)	1,94 ± 0,19	24,05
Vofm-3	547	56,25 (41,12-77,90)	0,28 (0,18-0,43)	499,70 (312,5-945,81)	0,21 (0,10-0,45)	1,35 ± 0,13	1,22
Vofm-5	559	44,71 (33,08-60,21)	0,35 (0,23-0,54)	335,36 (223,55-573,2)	0,31 (0,16-0,60)	1,46 ± 0,13	2,66
Vofm-7	550	30,89 (23,80-39,78)	0,51 (0,35-0,76)	121,78 (87,55-194,08)	0,85 (0,46-1,56)	2,15 ± 0,25	0,42
Vofm-10	1017	78,16 (60,87-99,43)	0,20 (0,14-0,30)	797,20 (566,64-1,22 × 10 ³)	0,13 (0,07-0,24)	1,27 ± 0,09	0,63
Vofm-12	498	29,47 (21,09-40,58)	0,54 (0,35-0,83)	238,09 (156,31-416,13)	0,43 (0,22-0,85)	1,41 ± 0,14	0,50
Vofm-14	500	86,49 (62,49-118)	0,18 (0,12-0,28)	611,75 (404,79-1,07 × 10 ³)	0,17 (0,09-0,33)	1,51 ± 0,15	2,41

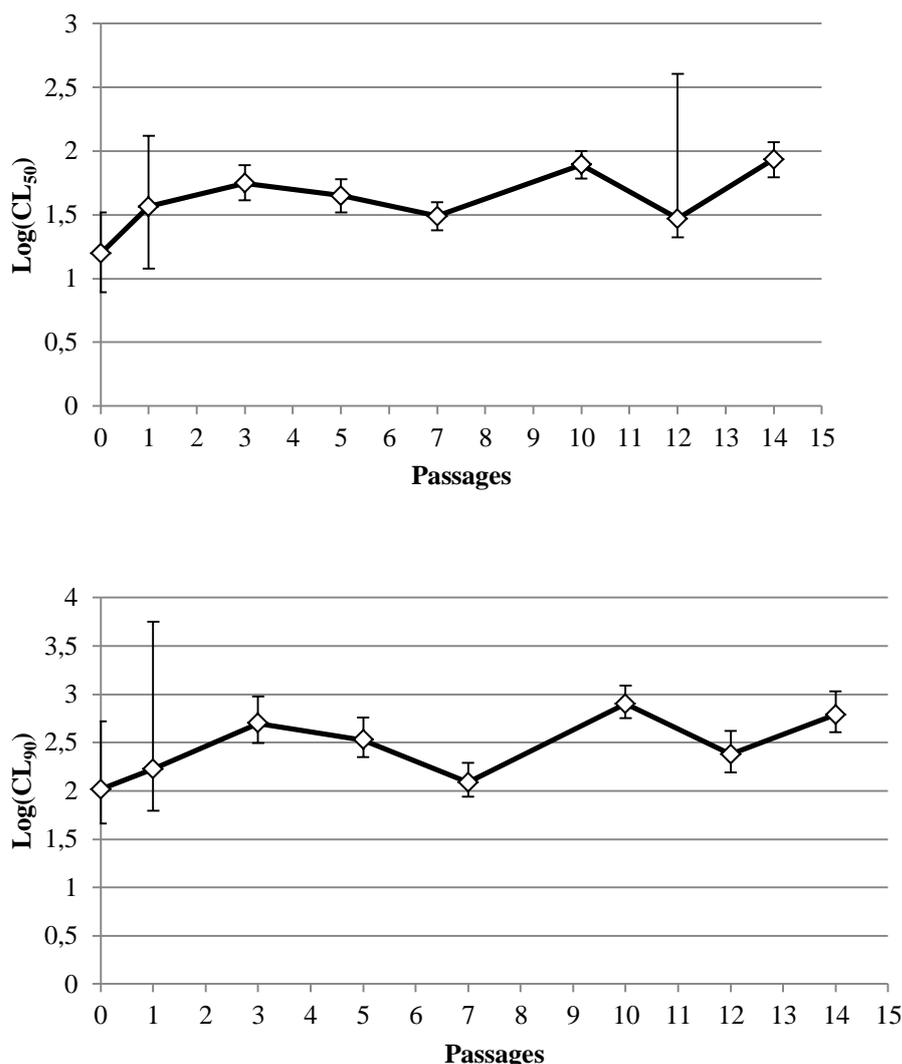


Figure 6.5. Efficacité sur Carpacse des productions virales issues des passages successifs du mélange viral produit sur TO.

La pathogénicité sur CpNPP des OB produits sur TO est globalement maintenue, même si au cours des passages, des oscillations apparaissent, surtout au niveau de la CL₉₀. Les CL₅₀ de toutes les productions sont similaires, alors que la CL₉₀ de certaines productions est un peu plus élevée (CL₉₀ : Vofm-3 : 499,7 (312,5 - 945,81) ; Vofm-10 : 797,2 (566,64 - $1,22 \times 10^3$) ; Vofm-14 : 611,75 (409,79 - $1,07 \times 10^3$) que celle de l'isolat le plus efficace, Vofm-7 (CL₉₀ : 121,78 (87,55 - 194,08)). L'isolat Vofm-12 précédemment sélectionné pour son efficacité sur TO présente une très bonne efficacité sur CpNPP (Vofm-12 : CL₅₀ : 29,47 (21,09 - 40,58) CL₉₀ : 121,78 (87,55 - 194,08)), comparable à l'efficacité de CpGV-M sur CpNPP. Une analyse plus approfondie serait nécessaire pour vérifier si ces oscillations correspondent à des effets d'échantillonnage ou de dérive, ou s'ils révèlent une tendance sous-jacente.

L'isolat Vofm-12 a été testé sur larves de carpocapses résistantes à CpGV-M et il s'est avéré que cet isolat était capable de contrôler convenablement ces insectes ((CL₅₀ : 142,13 (17,57 - 408,33) CL₉₀ : $2,29 \times 10^3$ (764,49 - $3,16 \times 10^4$) sur un effectif de 376 larves), sans pour autant égaler l'efficacité de CpGV-R5 sur R_{GV}.

2.3. Production de Vofm-12 sur population de carpocapses sensibles et test d'efficacité

Le virus issu du 12^{ème} passage du mélange viral sur larves de tordeuse orientale a été produit sur une population sensible de carpocapse des pommes (CpNPP) pour simuler une production industrielle ; la production du virus et l'entretien des élevages étant beaucoup plus faciles à gérer en conditions industrielles sur le carpocapse des pommes que sur la tordeuse orientale. La production de ce virus sur CpNPP est de $4,40 \times 10^{11}$ OB/g de larve ($\pm 0,23 \times 10^{11}$) soit $2,13 \times 10^{10}$ OB/larve ($\pm 0,12 \times 10^{11}$). Ce chiffre est comparable à celui obtenu avec CpGV-R5 (voir chapitre 4, [tableau 4.1](#)) et indique clairement que le virus peut être produit sur CpNPP.

Des tests d'efficacité sur carpocapse et tordeuse orientale ont été effectués avec cet isolat produit sur CpNPP (appelé Vofm-12-cp) et une perte d'efficacité d'un facteur 4 est observée sur tordeuse (CL₅₀ : 296,04 (186,33 – 468,76) ; CL₉₀ : 2348,24 ($1,32 \times 10^3$ – $5,51 \times 10^3$) et d'un facteur 1,5 sur CpNPP (CL₅₀ : 50,96 (7,97 – 157,06) ; CL₉₀ : 340,88 (118,26 – $1,23 \times 10^4$).

2.4. Profils enzymatiques et analyse du gène *pe38*

Des profils de restriction ont été effectués avec les enzymes *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* et *SalI* sur CpGV-M, CpGV-R5, Vofm-12 et Vofm-12-cp. Ces profils révèlent que Vofm-12-cp a le même profil pour les 4 enzymes que Vofm-12. Ces données indiquent qu'un passage sur l'hôte d'origine ne modifie pas le génotype du virus. Il est intéressant de noter que ces deux isolats possèdent un profil proche de celui de CpGV-M pour l'enzyme *BamHI*, proche de CpGV-R5 pour les enzymes *EcoRI* et *SalI* et un mélange des deux pour *PstI*. Le profil n'est pas présenté ici, la photo étant de très mauvaise qualité.

Aucune différence n'a été observée au niveau de la zone du gène *pe38* entre différentes productions de l'isolat Vofm-12-cp par rapport à Vofm-12. Une forte proportion du génome de CpGV-M et une très faible de CpGV-R5 sont observées dans toutes ces productions. Ces résultats sont présentés dans la [figure 6.6](#).

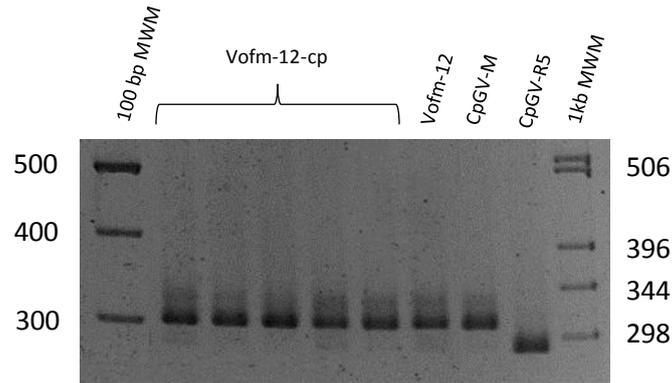


Figure 6.6. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 grâce au marqueur CpGV-18800 localisé dans le gène *pe38* pour les isolats CpGV-M, CpGV-R5, Vofm-12 et 5 productions indépendantes de l'isolat Vofm-12-cp.

3. Discussion

L'amplification par passages successifs d'une population virale synthétique obtenue en mélangeant 4 isolats de CpGV sur la tordeuse orientale a permis d'augmenter l'efficacité de ce mélange sur la colonie de laboratoire de cet insecte. Un gain d'efficacité de 450 fois a été constaté entre le mélange d'origine et le virus issu du 12^{ème} passage (Vofm-12). Cet isolat viral est aussi 120 fois plus efficace que CpGV-M seul. Aucune perte d'efficacité sur la colonie de référence de l'hôte d'origine, i.e. *C. pomonella*, n'a été constatée au cours des passages sur tordeuse orientale, indiquant que ce virus peut être utilisé à la fois pour contrôler *C. molesta* mais aussi les populations sensibles de *C. pomonella*. L'isolat Vofm-12 a une activité significative envers la colonie R_{GV} de *C. pomonella*, résistante au CpGV-M, mais avec une efficacité en deçà de celle de CpGV-R5.

Si on compare nos résultats avec ceux publiés par Kraaz *et al.* (2011), on observe une amélioration 10 fois supérieure dans notre cas. Ceci pourrait être dû à notre approche d'utilisation d'un isolat viral de départ riche du point de vue génotypique.

Il nous a été possible de démontrer que le virus est capable de s'adapter à un nouvel hôte (TO), de même qu'il s'est adapté à une population de son hôte d'origine présentant des caractéristiques génétiquement différentes (R_{GV}). Quelles sont les limites de cette adaptation ? Est-il possible de prédire qu'un virus pourra, ou non, s'adapter à un hôte ? Nous n'avons pas la réponse. Des expériences de changement d'hôtes ont été réalisées auparavant, surtout chez

les NPV. Les travaux sur le *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ont montré que le blocage se situe au niveau de la réplication du virus, et que la substitution de quelques aminoacides dans l'hélicase virale (gène *p143*) suffisent à lui permettre une extension de spectre d'hôtes (Kondo et Maeda, 1991, Maeda *et al.*, 1993 ; Croizier *et al.*, 1994 ; Kamita & Maeda, 1997 ; Argaud *et al.*, 1998). Par contre, chez d'autres virus, le point de blocage n'est pas le même. Ainsi, chez AcMNPV, l'ajout d'un gène provenant de *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus, permet sa réplication sur les cellules de *Lymantria dispar* Ld652Y. Ce gène a été appelé *host range factor 1* (*hrf1*) (Chen *et al.*, 1998). Aucune règle n'a été trouvée permettant une prédiction (Miller et Lu., 1997). Pour chaque hôte potentiel/virus, des recherches doivent être faites, les points de blocage de la réplication virale ne sont pas identiques et le ou les gènes impliqués sont souvent différents.

Dans notre cas, la justification principale de cette recherche de changement de spectre d'hôte, voire d'élargissement, était clairement à visée appliquée, pour la protection des cultures. Les résultats obtenus sont satisfaisants, même si les concentrations létales obtenues sur *C. molesta* sont plus élevées que celles habituellement observées sur le carpocapse. Ceci peut être dû à une plus petite taille de la larve, ce qui veut dire vraisemblablement une plus faible dose ingérée. Il faudrait pouvoir mesurer précisément cette dose ingérée pour comparer de façon précise.

Cette adaptation à la tordeuse orientale se fait sans perte importante de capacité pathogène sur l'hôte d'origine.

Pour permettre une production plus simple de cet isolat, nous avons testé la productivité et vérifié si une perte d'efficacité était observée après multiplication sur le carpocapse. L'étude de la productivité nous montre que le virus peut être amplifié sans problème sur l'hôte d'origine avec une productivité proche de celle de CpGV-R5 sur CpNPP. En ce qui concerne l'efficacité, nous avons constaté, malgré le fait que les profils de restrictions soit identiques, une légère perte d'efficacité de l'ordre d'un facteur 4 sur TO et d'un facteur 1,5 sur carpocapse. L'efficacité reste cependant acceptable et 2 fois meilleure qu'énoncée par Kraaz *et al.* (2011).

4. Conclusion

Comme pour l'isolat NPP-R1, il a été possible d'adapter le CpGV à un hôte non-permissif par passages successifs. Le virus Vofm-12 obtenu permet un contrôle optimal des larves de tordeuse orientale du pêcher mais aussi du carpocapse des pommes. La possibilité de le multiplier sur larves de carpocapses sensibles au CpGV-M sans perte majeure d'efficacité permettrait une production industrielle plus facile. Des essais en verger avec ce virus seront cependant nécessaires pour évaluer sa capacité à contrôler les populations naturelles de tordeuse orientale du pêcher.

Conclusion de la partie

Les isolats naturels de virus sont capables, dès l'origine, de contourner les résistances. Cette capacité préexistante peut cependant être améliorée par sélection, comme démontré dans cette partie. Dans les deux cas décrits précédemment, ces améliorations se traduisent par une baisse de la diversité apparente. Il n'y a, par contre, aucune perte d'efficacité envers les hôtes d'origine.

Nos résultats questionnent directement la théorie du trade-off. Cette théorie, pour la première fois énoncée par Anderson & May (1982), décrit l'impossibilité pour un organisme (i.e. un virus) d'augmenter indéfiniment sa fitness sans en payer le prix (Alizon *et al.*, 2009). Des compromis seront donc obligatoires pour un organisme, résumés en une perte de certaines capacités pour en obtenir de nouvelles.

Dans ces conditions, peut-on imaginer la possibilité d'acquisition de la capacité de se répliquer dans un nouvel hôte sans perdre la capacité de se répliquer dans celui d'origine ? En ne suivant que la théorie du trade-off, il apparaît que non. Cette théorie favorise les populations spécialistes en prédisant qu'au cours de cycles de réplication dans un même environnement, la population va s'adapter à son environnement mais, qu'en contrepartie, cette population perdra l'adaptation pour d'autres environnements. Il apparaît que cette affirmation n'est pas toujours vraie. Il est possible, comme dans nos exemples, que le virus soit capable d'emprunter plusieurs voies pour arriver à infecter un hôte. Nos résultats semblent indiquer que les populations virales ne changent pas complètement de voie évolutive lors d'un changement drastique d'environnement (i.e. d'hôte) mais que ce changement de chemin est beaucoup plus complexe.

Quel est le prix à payer pour le virus à étendre sa gamme d'hôte ? Nos résultats semblent indiquer que le seul coût pour la population virale est une baisse de sa diversité génétique. En effet, les populations virales qui ont, par exemple, été successivement produites sur un hôte non permissif ont perdu une partie importante de leur diversité.

Le virus de la granulose se maintient-il dans les vergers ? Nous avons fait des détections de virus sur des larves diapauses et environ 8% des individus testés étaient infectés. D'autres analyses ont été effectuées sur les adultes et descendants de ces larves ainsi que dans des parcelles traitées ou non au CpGV mais les résultats obtenus ne permettent pas d'arriver à une quelconque conclusion quant au mode de transmission du virus. Des résultats préliminaires

nous indiquent cependant une présence du virus dans des œufs issus de deux parents infectés dont un sorti de diapause. Ces résultats pourraient constituer le premier indice sur le mode de transmission du virus mais restent trop préliminaires pour être exploités, de nouvelles analyses seront requises.

Partie 3 : Diversité génétique et étude du maintien des populations virales

Chapitre 7. Caractéristiques biologiques de différents mélanges expérimentaux de CpGV : capacité à contrôler les populations sensibles et résistantes

Les résultats présentés dans ce chapitre sont à l'origine de la publication : **Graillot, B., Bayle, S., Blachere-López, C., Besse, S., Siegwart, M. & López-Ferber, M.** 2014. Biological characteristics of experimental CpGV mixed genotype isolates: ability to control susceptible and resistant host populations. *Applied and Environmental Microbiology*, (soumis) et d'une communication orale en août 2014 lors du meeting de la Society for Invertebrate Pathology à Mainz en Allemagne.

1. Introduction

La diversité génétique chez les populations de parasites est un facteur important dans l'évolution continue des capacités de défense de l'hôte (Read & Taylor, 2001 ; Mideo, 2009). Les populations naturelles de virus sont génétiquement hétérogènes ; certains variants génotypiques pouvant être prévalents sur d'autres (Muñoz *et al.*, 1998; Hitchmann *et al.*, 2007). Le fait que les génotypes minoritaires ne soient pas éliminés dans les populations sauvages suggère que l'hétérogénéité est un paramètre important pour la survie virale (Possee & Rohrmann, 1997). Les pressions qui favorisent et maintiennent la diversité génétique dans les populations virales sont complexes et semblent dépendre de procédés agissant sur la reproduction des parasites au sein des hôtes, favorisant certains génotypes, et de procédés agissant sur la transmission d'hôte à hôte, pouvant privilégier d'autres variants (Ebert & Hamilton, 1996). Chez les baculovirus, ces deux processus étant gérés par des particules virales phénotypiquement différentes, ils peuvent, au moins partiellement, être analysés de façon dissociée.

Comme les pathogènes et leurs hôtes coévoluent depuis très longtemps, il a été postulé que la résistance d'un ravageur aux produits issus de son pathogène (Huber, 1986) ne pouvaient en aucun cas se produire, contrairement aux développements de résistances observés avec les insecticides chimiques (Hoy, 1998). Le développement de l'utilisation de pathogènes d'insectes en lutte biologique inondative était complètement basé sur cette affirmation.

Briese *et al.* (1980) ont cependant indiqués que « si une sélection de résistance peut être produite en laboratoire, la même chose peut se produire en champs avec une exposition continue au virus ».

Comme indiqué en introduction, la pomme est le troisième fruit le plus produit au monde (FAOSTATS, 2013) et son ravageur principal est le carpocapse (*Cydia pomonella*). Le CpGV a été utilisé pendant plus de 20 ans jusqu'à l'apparition des premiers cas de résistances en vergers (Fritsch *et al.*, 2005 ; Sauphanor *et al.*, 2006), confirmant les hypothèses de Briese *et al.* (1980). Pour contourner cette résistance, des études ont été menées dans le but d'obtenir un nouveau variant viral capable de contrôler ces populations d'insectes résistants. Une vaste collection d'isolats viraux a été prélevée dans différentes zones géographiques (Rezapanah *et al.*, 2008). De nouveaux isolats ont été caractérisés en testant ces collections et en sélectionnant des isolats provenant de collections de laboratoire contre les larves de carpocapses résistants (Eberle *et al.*, 2008 ; Berling *et al.*, 2009), montrant qu'une importante variabilité génétique est présente dans les populations de granulovirus et que cette variabilité conduit à des différences biologiques.

La présence d'individus sensibles et résistants dans les populations d'hôte soulève cependant la question sur la capacité relative d'un seul génotype viral à contrôler toutes les populations et le risque de développement de nouvelles résistances.

La question majeure qui se profile est pourquoi la résistance à un virus donné, i.e. le CpGV, se produit en agrosystèmes et ne se produit pas durant l'évolution naturelle virus-hôte ? Fuxa (2004) a souligné l'importance de la capacité du virus à prévenir la résistance de l'hôte en conditions naturelles. Une réponse possible pourrait être liée à la différence entre l'homogénéité génétique au cours du temps et dans l'espace de l'agent de biocontrôle et la diversité des isolats naturels (diversité à un moment donné avec plusieurs génotypes au sein du même isolat viral, diversité géographique mais aussi diversité temporelle avec des modifications dans le génotype au cours du temps).

La variabilité génétique a été décrite au début des années 80 chez les populations de NPV (Lee & Miller, 1978) et de GV (Crook *et al.*, 2005 ; Jehle *et al.*, 2003 ; Vickers *et al.*, 1991). La variabilité chez les NPV semble être plus importante que chez les GV.

Ces dernières années, un regain d'intérêt pour le rôle de la diversité génétique a conduit à explorer plus précisément la structure des populations naturelles sauvages de NPV (Graham *et al.*, 2004) et les mécanismes impliqués dans la génération et le maintien d'une telle diversité.

Le phénomène de coinfection des cellules hôtes a été étudié chez *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) et s'est révélé être un trait généralisé chez AcMNPV (Bull *et al.*, 2001). La co-occlusion et le co-enveloppement (la possibilité de transmission de plus d'un génotype dans un seul polyèdre ou un seul virion, respectivement) ont été démontrés pour *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus, SfMNPV (Lopez-Ferber *et al.*, 2003; Clavijo *et al.*, 2009). Un tel mécanisme conduit à une augmentation de la transmission pour une population virale (Simon *et al.*, 2005). La différence dans la structure des OB entre NPV et GV peut être mise en relation avec la plus faible variabilité apparente chez ces derniers : un seul OB d'un NPV contenant plusieurs virions peut représenter à lui seul la diversité de la population; un seul OB de GV ne contient qu'un génotype. Une infection avec un seul OB de NPV conduit à une infection génotypiquement diverse alors que pour le GV elle conduit à une infection clonale.

Dans un autre système virus/hôte (SfMNPV-NIC et *Spodoptera frugiperda*), Simon *et al.* (2005) ont montré que l'hétérogénéité génétique contribue à l'efficacité des populations virales et que ces populations expérimentales, génétiquement hétérogènes, étaient plus efficaces que les génotypes individuels seuls. Plus récemment, de nouvelles études utilisant des techniques de séquençage massif de plusieurs populations d'AcMNPV ont montré une variabilité encore plus importante que ce que nous pouvions imaginer (Chateigner A., 2014, Thèse de doctorat).

La même approche a été testée dans ce chapitre avec le CpGV sur des populations de carpocapse sensibles et résistantes au CpGV-M. Cinq mélanges ont été réalisés avec CpGV-M et CpGV-R5 (Tableau 2.1) et testés sur larves sensibles et résistantes. Les proportions de chaque génome ont aussi été évaluées par PCR quantitative après une production de chaque mélange sur larves sensibles et résistantes.

2. Résultats

2.1. Réplication des génotypes viraux dans les différents hôtes

La réplication des isolats CpGV-M et CpGV-R5 a été analysée par PCR quantitative, en utilisant des marqueurs spécifiques, sur des OB produits sur larves sensibles (CpNPP) et résistantes (R_{GV}). Les résultats sont listés dans le [tableau 7.1](#).

La proportion relative de chaque marqueur a été estimée en comparant l'amplification pour le marqueur « CpGV 15600 » avec le marqueur commun « CpGV-138200 ». Lors d'une infection de larves CpNPP et R_{GV} par CpGV-R5, aucun marqueur de CpGV-M n'a été trouvé. De même, aucun marqueur de CpGV-R5 n'est trouvé lors d'une infection de CpNPP par CpGV-M. L'inoculation de larves R_{GV} avec CpGV-M à une concentration de 800 OB/ μ L ne permettait pas d'induire une mortalité. Pour vérifier l'absence d'une infection latente ou d'une contamination par CpGV-R5 dans les larves R_{GV} , les insectes sont inoculés à une concentration de 30 000 OB/ μ L. Aucun marqueur de CpGV-R5 n'a été retrouvé dans la descendance virale provenant des larves ayant développé des signes d'infection dans ces conditions.

Des marqueurs correspondant aussi bien à CpGV-M et CpGV-R5 ont été détectés dans la descendance virale de chaque mélange produit sur CpNPP indiquant que les deux virus sont capables d'infecter les cellules hôte et de s'y répliquer. Étonnamment, des marqueurs correspondant aux deux isolats viraux sont aussi retrouvés dans la descendance virale du mélange amplifiée sur R_{GV} , indiquant que CpGV-M est capable, en présence de CpGV-R5, d'infecter des cellules hôtes résistantes et de se répliquer.

Tableau 7.1. Proportion relative du marqueur spécifique « CpGV-15600 » comparé au marqueur commun « CpGV-138300 » dans les différents mélanges et dans les OB collectés après une amplification (P1) de ces mélanges sur larves sensibles (CpNPP) et résistantes (R_{GV}).

Composition des mélanges	M100		M99-R01		M95-R05		M90-R10		M50-R50		M10-R90		R100		
	M%	R%	M%	R%	M%	R%	M%	R%	M%	R%	M%	R%	M%	R%	
Origine des marqueurs															
Mélange inoculé	100	0	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90	0	100	
OB produits	P1/CpNPP		100	0	25	75	76	24	35	65	52	48	1	99	0
	P1/R _{GV}		100	0	100	0	100	0	42	58	38	62	43	57	0

R=CpGV-R5; M = CpGV-M

2.2. Efficacité des virus purs

L'efficacité des populations virales mélangées sur les trois colonies d'insectes (CpLGEI, CpNPP et R_{GV}) est détaillée dans le [tableau 7.2](#) et les [figures 7.1 à 7.4](#).

Tableau 7.2. Pathogénicités, mesurées par CL₅₀ et CL₉₀ de deux isolats viraux (CpGV-M et CpGV-R5) et de 5 mélanges de ces deux isolats en différentes proportions sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensible (CpNPP) et résistantes au virus (R_{GV}).

Colonie d'insecte	Proportions des isolats viraux (%)		Nb. de témoins	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/μL (95% IC)		Pente ± ES	χ ²
	CpGV-M	CpGV-R5			CL ₅₀	CL ₉₀		
CpNPP	100	0	257	529	13,10 (6,55-23,2)	223,1 (110,7-654,18)	1,04 ± 0,09	5,99
	99	1	244	520	28,84 (4,15-55,91)	172,4 (86,3-1828,76)	1,65 ± 0,25	9,98
	95	5	291	696	13,15 (8,91-18,58)	98,51 (63,835-180,57)	1,47 ± 0,17	1,43
	90	10	166	361	8,46 (1,67-22,56)	90,33 (31,76-1646,44)	1,25 ± 0,15	12,87
	50	50	165	350	10,69 (5,56-18,39)	94,29 (49,24-278,52)	1,36 ± 0,12	4,23
	10	90	163	352	3,40 (1,09-4,40)	22,29 (11,12-119,03)	1,57 ± 0,24	6,43
	0	100	257	533	6,76 (2,6-13,37)	59,63 (27,54-278,55)	1,36 ± 0,13	11,42
Sv	100	0	56	265	34,19 (23,74-46,41)	125,40 (85,69-239,73)	2,27 ± 0,39	3,78
	99	1	43	89	17,31 (3,85-43,95)	347,33 (123,37-3,04 × 10 ³)	0,98 ± 0,24	3,68
	95	5	43	216	104,88 (27,81-255,15)	770,63 (307,56-6,96 × 10 ³)	1,48 ± 0,22	6,93
	90	10	90	312	24,76 (2,87-90,81)	1,55 × 10 ³ (326,56-1,15 × 10 ⁵)	0,71 ± 0,09	10,48
	50	50	138	444	30,09 (9,95-70,1)	1,08 × 10 ³ (371,27-8,11 × 10 ³)	0,82 ± 0,08	7,84
	10	90	97	213	70,91 (8,51-350,44)	804,14 (193,37-1,02 × 10 ⁵)	1,22 ± 0,15	14,89
	0	100	73	184	31,90 (4,13-105,64)	438,28 (127,32-1,94 × 10 ⁴)	0,13 ± 0,18	8,45
CpLGEI	100	0	221	652	123,93 (6,69-1,32 × 10 ³)	2,7 × 10 ⁴ (2,07 × 10 ³ -3,36 × 10 ⁹)	0,55 ± 0,05	27,31
	99	1	39	175	36,45 (10,09-79,04)	604,53 (282,69-2,06 × 10 ³)	1,05 ± 0,21	2,80
	95	5	28	188	431,71 (132,42-1447,66)	2,83 × 10 ³ (978,02-1,19 × 10 ⁵)	1,57 ± 0,23	2,09
	90	10	115	548	49,80 (34,31-69,62)	763,80 (501,45-1,30 × 10 ³)	1,08 ± 0,09	2,05

Colonie d'insecte	Proportions des isolats viraux (%)		Nb. de témoins	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/μL (95% IC)		Pente ± ES	χ ²
	CpGV-M	CpGV-R5			CL ₅₀	CL ₉₀		
CpLGEI	50	50	181	724	29,27 (14,75-51,57)	405,02 (205,49-1,14 × 10 ³)	1,12 ± 0,08	8,2
	10	90	48	375	70,40 (24,50-211,36)	555,50 (190,35-7,30 × 10 ³)	1,43 ± 0,12	18,86
	0	100	134	281	20,21 (13,94-27,95)	93,09 (62,571-169,547)	1,93 ± 0,27	1,28
R _{Gv}	100	0	135	261	7,84 × 10 ³ (660,45-4,13 × 10 ⁴)	1,17 × 10 ⁶ (2,15 × 10 ⁵ - 6,72 × 10 ⁸)	0,55 ± 0,09	6,32
	99	1	42	174	1,77 × 10 ³ (813,25-5,08 × 10 ³)	1,89 × 10 ⁴ (6,16 × 10 ³ -3,08 × 10 ⁵)	1,25 ± 0,21	4,11
	95	5	122	356	265,49 (51,85-982,95)	7,59 × 10 ³ (1,78 × 10 ³ -3,17 × 10 ⁵)	0,88 ± 0,09	22,41
	90	10	215	817	201,78 (139,95-280,83)	2,35 × 10 ³ (1,51 × 10 ³ -4,23 × 10 ³)	1,20 ± 0,09	5,46
	50	50	221	973	16,45 (8,41-29,07)	311,55 (151,53-938,21)	1,00 ± 0,06	16,35
	10	90	86	361	31,64 (20,54-44,42)	185,86 (125,53-330,04)	1,67 ± 0,23	1,11
	0	100	176	369	22,43 (13,73-34,36)	410,67 (240,16-846,43)	1,02 ± 0,11	3,60

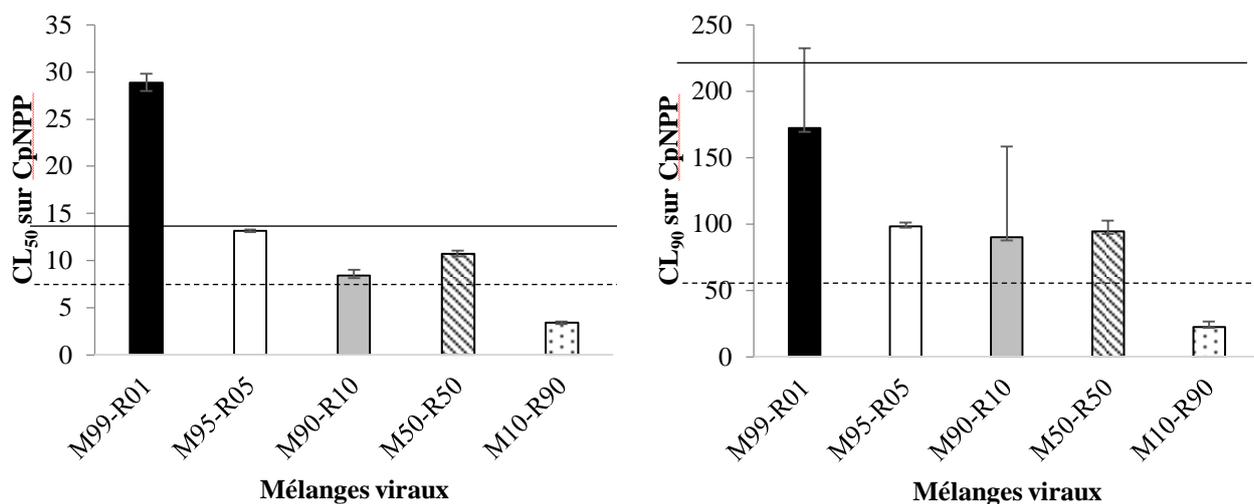


Figure 7.1. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) des 5 mélanges viraux sur la colonie sensible CpNPP. La ligne pleine représente l'efficacité de CpGV-M sur CpNPP, la ligne pointillée celle de CpGV-R5 sur CpNPP.

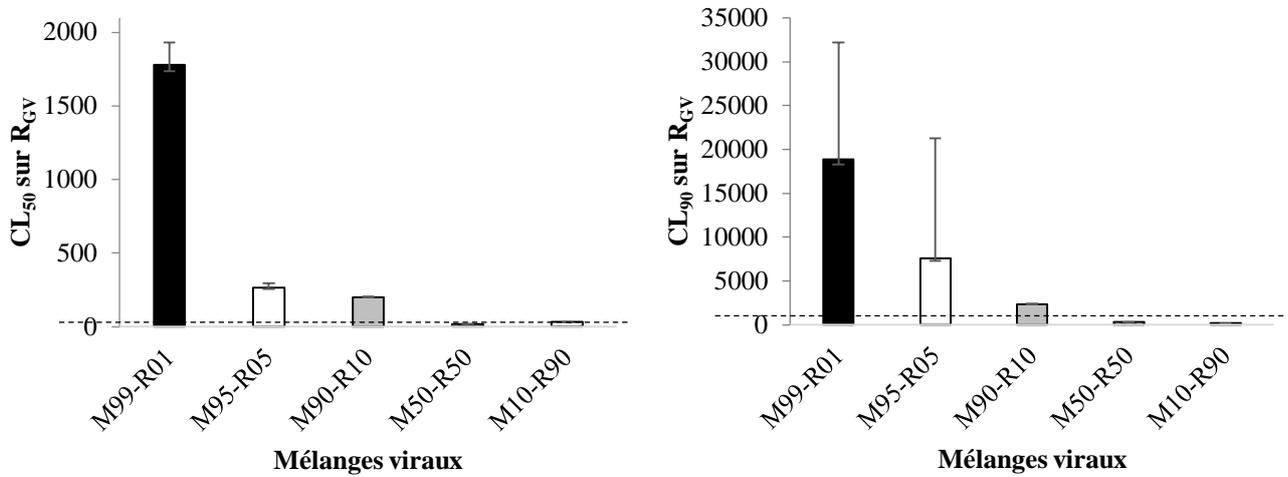


Figure 7.2. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) des 5 mélanges viraux sur la colonie résistante R_{GV}. L'efficacité de CpGV-M sur R_{GV} ne peut pas s'inscrire dans ce graphe car CpGV-M n'infecte pas R_{GV}, la ligne pointillée représente l'efficacité de CpGV-R5 sur R_{GV}.

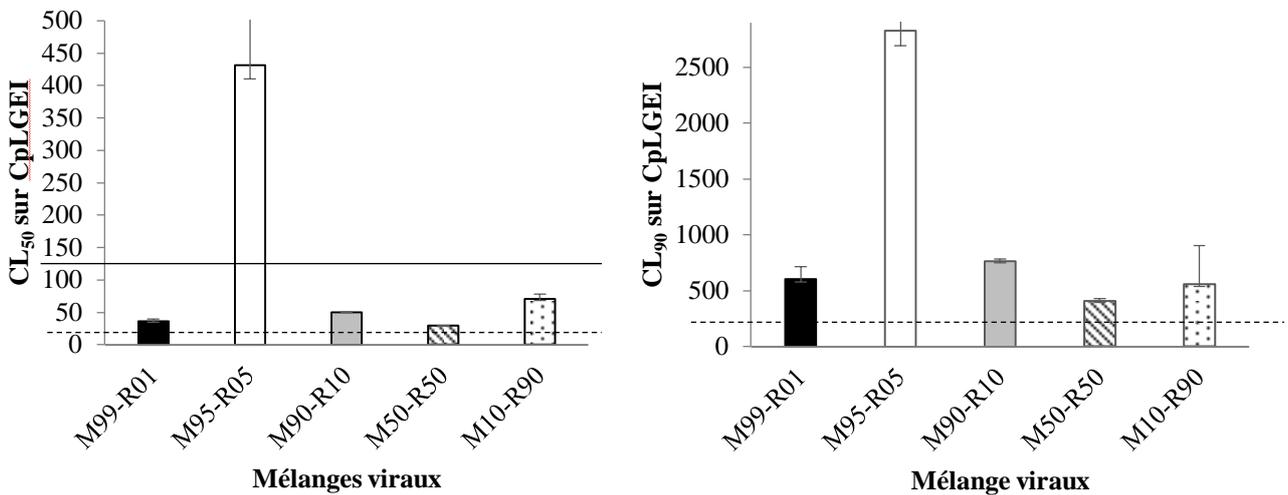


Figure 7.3. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) des 5 mélanges viraux sur la colonie mélangée CpLGEI. La ligne pleine représente l'efficacité de CpGV-M sur CpLGEI, la ligne pointillée celle de CpGV-R5 sur CpLGEI.

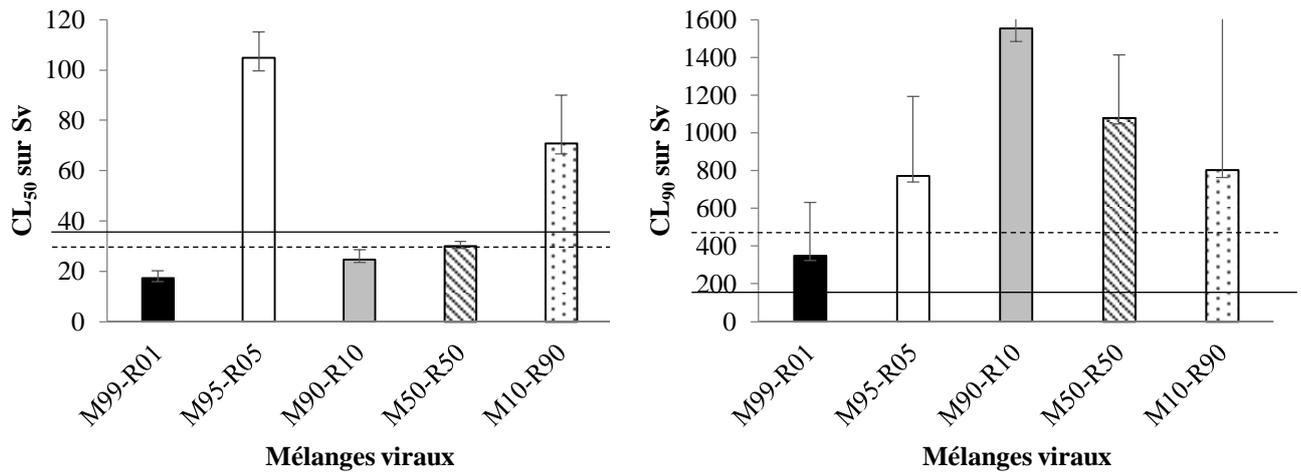


Figure 7.4. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) des 5 mélanges viraux sur la colonie sensible Sv. La ligne pleine représente l'efficacité de CpGV-M sur Sv, la ligne pointillée celle de CpGV-R5 sur Sv.

Comme prévu, l'isolat CpGV-M est capable de contrôler efficacement les colonies sensibles, CpNPP (CL₅₀ : 13,10 (6,55 - 23,2) CL₉₀ : 223,1 (110,7 - 654,18)) et Sv (CL₅₀ : 34,19 (23,47 - 46,41) CL₉₀ : 125,4 (85,69 - 239,73)). De plus fortes concentration de CpGV-M sont requises pour tuer les larves résistantes R_{GV} (CL₅₀ : $7,84 \times 10^3$ (660,45 - $4,13 \times 10^4$) CL₉₀ : $1,17 \times 10^6$ ($2,15 \times 10^5$ - $6,72 \times 10^8$)), ce qui concorde avec de précédents résultats : la CL₅₀ est multipliée par 550 ($7,84 \times 10^3$ OB/ μ L sur R_{GV} contre 13,10 OB/ μ L sur CpNPP). Comme constaté précédemment, la concentration de 800 OB/ μ L utilisée est très en dessous de la concentration requise pour tuer les larves R_{GV}.

La colonie mélangée CpLGEL, contenant environ 10% de génotypes résistants et 90% de génotypes sensibles, présente, comme attendu, une sensibilité intermédiaire à CpGV-M. La différence observée n'est pas très importante pour la CL₅₀ mais cette différence est plus marquée pour la CL₉₀ (LC₅₀ : 123,93 (6,69 - $1,32 \times 10^3$) CL₉₀ : $2,7 \times 10^4$ ($2,07 \times 10^3$ - $3,36 \times 10^9$)). Cet effet est clairement visible sur la [figure 7.5 A](#). Un plateau est observé à 80% de mortalité : tous les individus sensibles sont tués mais les individus résistants survivent. Aucune explication n'a été trouvée pour la forte mortalité observée à faible dose, formant le premier plateau à environ 20% de mortalité.

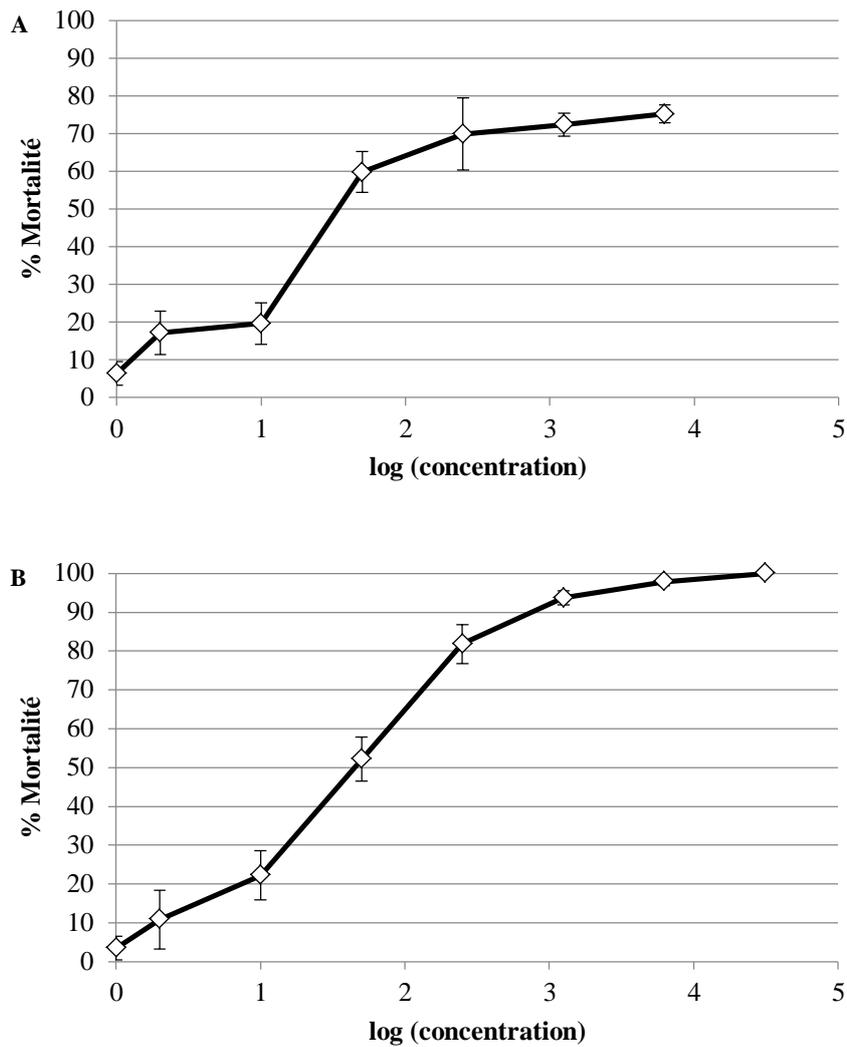


Figure 7.5. Représentation dose/mortalité sur les colonies CpLGEI pour CpGV-M (A) et le mélange M90-R10 (B).

Comme attendu, CpGV-R5, actif aussi bien sur les populations sensibles que résistantes, est capable de contrôler la population mélangée CpLGEI (CL_{50} : 20,21 (13,94 - 27,95) CL_{90} : 93,09 (62,571 - 169,55)). La CL_{50} de CpGV-R5 pur est comprise entre 6,76 OB/ μ L et 22,43 OB/ μ L. Sur colonie sensible CpNPP, CpGV-R5 (CL_{50} : 6,72 (2,6 - 13,37) CL_{90} : 59,63 (27,54 - 278,55)) est plus efficace que CpGV-M (LC_{50} : 13,10 (6,55 - 23,2) LC_{90} : 223,1 (110,7 - 654,18)).

2.3. Efficacité des populations mélangées de virus

Sur les insectes sensibles, CpNPP, la meilleure pathogénicité (i.e. la plus faible valeur de $LC_{50/90}$) est obtenue avec une population mélangée composée de 10% de CpGV-M et 90% de CpGV-R5 (CL_{50} : 3,4 (1,09 - 4,40) CL_{90} : 22,29 (11,12 - 119,03)). Les différences d'efficacité entre toutes les populations virales ne sont cependant pas très importantes mais toutefois statistiquement significatives ($\chi^2=115$, ddl=12, $P<0.05$), comprises entre 3,4 (1,09 - 4,40) OB/ μ L et 28,84 (4,15 - 55,91) OB/ μ L pour la CL_{50} .

Pour la colonie d'insectes R_{GV} , la présence du génotype CpGV-R5, même en faibles proportions, résulte en une baisse importante des valeurs de $LC_{50/90}$.

En présence d'insectes résistants, aussi bien issus de la colonie R_{GV} que de la colonie d'insectes hétérogène CpLGEI, l'inoculation même en très faible proportion, de génotype CpGV-R5 permet une baisse importante de la dose requise pour tuer les larves.

Une population mélangée composée de 50% de CpGV-M et 50% de CpGV-R5 est capable de contrôler les insectes résistants R_{GV} aussi efficacement que CpGV-R5 pur (hypothèse d'égalité : $\chi^2=1.46$, ddl=2, $P>0.05$; hypothèse de parallélisme: $\chi^2=0.00$, ddl=1, $P>0.05$).

La présence de seulement 1% de CpGV-R5 (et 99% de CpGV-M) montre une différence claire d'effet biologique sur des populations d'hôtes complètement ou partiellement résistants, comparé à CpGV-M pur. Une réduction de 3 fois de la CL_{50} et de 100 fois de la CL_{90} est observée (M99-R01 sur CpLGEI : CL_{50} : 36,45 (10,09 - 79,04), CL_{90} : 604,53 (282,69 - 2.06×10^3 ; M99-R01 sur R_{GV} : CL_{50} : $1,77 \times 10^3$ (813,25 - $5,08 \times 10^3$), CL_{90} : $1,89 \times 10^4$ ($6,16 \times 10^3$ - $3,08 \times 10^5$)). Les valeurs obtenues pour la CL_{50} du mélange M95-R05 sur CpLGEI sont probablement aberrantes.

La relation dose/mortalité de CpGV-M sur la population CpLGEI (Figure 7.5 A) est typiquement une réponse de population mélangée. En testant les populations virales mélangées sur la colonie CpLGEI, la réponse est similaire à celle obtenue avec un génotype viral unique sur population complètement sensible. La figure 7.5 B montre le résultat obtenu avec le mélange M90-R10. Cela indique qu'une population mélangée contenant une petite quantité de CpGV-R5 est capable de contrôler une population d'hôtes génétiquement hétérogène et que la présence de CpGV-M n'est pas neutre.

Pour la population virale mélangée M50-R50, l'hypothèse d'additivité est rejetée ($\chi^2 = 24,149$ pour ddl de 6; $P<0,001$; $\chi^2 = 91,123$ pour ddl de 5; $P<0,001$; et $\chi^2 = 54,472$, pour ddl de 5;

$P < 0,001$; respectivement pour R_{GV} ; CpNPP et CpLGEL). Les deux virus agissent de façon synergique. Les résultats obtenus pour les autres mélanges (M90-R10; M95-R05 and M99-R01) sur R_{GV} et CpNPP ne franchissent pas le seuil de signification.

L'efficacité des mélanges sur la colonie CpNPP n'a pas été développée car nous n'avons trouvé aucune logique dans ces résultats.

3. Discussion

Sur la colonie résistante (R_{GV}), le niveau de contrôle obtenu en utilisant un isolat pur de CpGV-R5 est satisfaisant, alors qu'une très forte concentration de l'isolat CpGV-M pur est requise pour contrôler efficacement cette population. Sur colonie sensible, cet effet n'a pas pu être observé, CpGV-M et CpGV-R5 seuls étant capables de contrôler cette population.

Il a été suggéré que le mécanisme de résistance pouvait être un dû à un blocage précoce de la réplication virale dans les cellules de l'insecte (Asser-Kaiser & Jehle, 2009 ; Asser-Kaiser *et al.*, 2011), aucune réplication n'étant observée lors d'une infection avec une faible dose de CpGV-M *per os* ou par injection (Asser-Kaiser *et al.*, 2011). Une infection létale peut cependant être établie en inoculant des insectes résistants avec de très fortes concentrations (Berling *et al.*, 2013).

CpGV-M n'étant pas capable de se répliquer dans les insectes résistants, nous pouvions nous attendre, en utilisant des isolats viraux mélangés, à une corrélation positive entre la proportion de CpGV-M et la dose requise pour tuer. Ce n'est pas du tout ce qui a été observé. La présence de CpGV-M a contribué à la pathogénicité globale de la population mélangée de virus. De plus, les marqueurs spécifiques de CpGV-M sont présents dans la descendance en OB, confirmant que la réplication dans un hôte résistant se produit. Or, les marqueurs que nous avons utilisés ne sont pas reliés à la capacité à se répliquer dans un hôte résistant, celle-ci étant reliée au gène *pe38* comme récemment démontré (Gebhardt *et al.*, 2014). Nous pensons que ces marqueurs ne sont pas sujet à sélection en fonction du génotype de l'hôte (sensible ou résistant). La présence de marqueurs originaires des deux génotypes dans la descendance de tous les mélanges indique que les deux virus infectent les larves et se répliquent efficacement.

Les résultats présentés ici indiquent que le mécanisme impliqué dans la restriction de la réplication de CpGV-M peut être pallié par la présence de CpGV-R5. Cette action d'aide de la

part de CpGV-R5 peut intervenir à différents niveaux, i.e. l'entrée dans l'insecte, la réplication dans les cellules de l'intestin, la dispersion dans les autres tissus et la réplication généralisée.

Le mécanisme d'aide peut être classé en deux catégories : ceux qui agissent en *trans* et ceux qui agissent en *cis*. Tanada & Hukuhara (1971) ont été les premiers à décrire les facteurs de synergie en analysant l'action d'aide d'un granulovirus. Ils ont démontré que l'effet pouvait être produit en *trans*, signifiant qu'une particule physique (un OB du *Pseudaletia Unipuncta* granulovirus (PuGV)) peut aider une autre particule (un OB du *Pseudaletia Unipuncta* Nucléopolyhédrovirus (PuNPV)) pour démarrer l'infection. Il a plus tard été montré que cette action était due à la présence de la membrane péritrophique (MP) dégradant les enzymes (Hashimoto *et al.*, 1991). Des effets similaires ont été obtenus en ajoutant des substances chimiques, comme l'azurant fluorescent FB28 à un inoculum d'OB.

Un blocage de l'infection des cellules épithéliales a été observé quand un ou plusieurs des composants structuraux du virus permettant la fusion à la membrane étaient absents. Ces composés sont appelés « *Per Os* Infectivity proteins » (PIF) (Peng *et al.*, 2012). Pour ces protéines, l'action d'aide se fait en *cis* : les protéines d'aide doivent être dans la même particule (Kikhno *et al.*, 2002). En mélangeant des OB défectifs PIF et des OB compétents PIF, la complémentarité ne peut se produire. Dans notre modèle, les populations mélangées de CpGV ont été obtenues en mélangeant des OB produits indépendamment et une action d'aide s'est produite. L'effet d'aide ne requiert aucun facteur de *cis*-action, comme observé chez d'autres systèmes de baculovirus (Lopez-Ferber *et al.*, 2003 ; Clavijo *et al.*, 2009 ; Simon *et al.*, 2005).

Une analyse détaillée du point de blocage pour CpGV-M chez les insectes résistants a été publiée (Asser-Kaiser *et al.*, 2011). L'addition d'azurant fluorescent FB28 ne permettait pas une infection productive, démontrant ainsi que le mécanisme impliqué dans la résistance n'était pas lié à la dégradation de la MP. De plus, les auteurs démontrent que le CpGV-M n'est pas capable de se répliquer, ni dans les cellules intestinales, ni dans toutes les autres cellules étudiées. Une incompatibilité cellule hôte/virus généralisée a été suggérée.

Une différence majeure entre MNPV et GV doit ici être considérée. Chez les MNPV, les ODV (occlusion derived virions) contiennent un nombre variable de génomes. Des génomes de virus défectifs peuvent être co-enveloppés dans le même virion avec réplication autonome des génomes et peuvent alors être transmis ensemble à un nouvel hôte, le génome complet

agissant comme un facteur d'aide aux virus défectifs pour l'entrée et la réplication dans les cellules de l'intestin. Chez les GV, comme l'ODV ne transporte qu'un seul génome, cet effet d'aide pour la réplication ne pourra se produire que si une cellule intestinale est infectée par deux virions simultanément. La DL_{50} du CpGV a été estimée entre 1,2 (Huber, 1986) et 5 (Lawrence *et al.*, 2008) OB/ μ L. Un niveau similaire est observé pour CpGV-R5 sur insectes résistants. En conséquence, l'infection multiple d'une cellule épithéliale est probablement un événement très rare, et chaque particule virale infectante doit être capable d'accomplir un cycle complet d'infection, de réplication et de transmission cellule à cellule dans l'insecte infecté. La présence de marqueurs de CpGV-M dans les OB produits suggère que, au moins au niveau de l'intestin, l'infection de la même cellule par plusieurs génotypes viraux n'est pas requise pour la réplication de CpGV-M.

En conséquence, comme la présence de CpGV-R5 dans l'hôte aide le génome CpGV-M à infecter les cellules, nous proposons qu'un facteur de diffusion sécrété par les cellules infectées par CpGV-R5 rend les cellules non-infectées permmissibles à l'infection par CpGV-M. Cette question sera explorée plus tard ([Chapitre 8](#)).

A faible dose, la plupart des larves mortes auront ingéré seulement un à quelques OB. Malheureusement, notre approche ne nous permet pas de vérifier la dose réelle ingérée. Pour cela, il faudrait utiliser la méthode du droplet feeding et évaluer le nombre d'OB ingérés. Nous nous sommes heurtés à des problèmes techniques qui ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats convaincants. Nous avons donc abandonné cette approche.

La probabilité d'ingestion d'un OB de CpGV-R5 augmente avec la proportion relative de CpGV-R5 dans le mélange ou avec la dose ingérée ; et inversement, elle décroît avec la proportion relative de CpGV-M. La plus haute probabilité d'obtenir une infection mixte est obtenue lorsque les deux virus sont présents à la même fréquence. Dans nos conditions, lors d'une infection d'hôtes avec un mélange viral contenant 50% de CpGV-R5, suivant la probabilité de distribution, toutes les larves devraient rencontrer les deux génotypes viraux. Le test d'additivité pour ce virus a été rejeté, indiquant un effet synergique lors de l'infection des larves par les deux virus. Inversement, pour les mélanges ayant une fréquence extrême d'un des deux génotypes, la probabilité d'une infection mixte dans une larve est faible, expliquant l'impossibilité de détecter une synergie. Similairement, nos données montrent que pour l'amplification virale (faite à une plus forte concentration, 800 OB/ μ L), presque toutes les larves mortes ont rencontré les deux génotypes viraux et que les deux génotypes viraux ont été transmis.

Sur une population mélangée, comme CpLGEI, les survivants à une infection par CpGV-M sont, normalement, des individus résistants. Dans ces conditions, ajouter une petite quantité de CpGV-R5 va réduire la CL_{90} , et aider à contrôler efficacement les populations et prévenir l'augmentation du nombre de résistants dans les générations futures

4. Conclusion de la partie

Utiliser des génotypes d'isolats viraux mélangés semble permettre un contrôle efficace tout en préservant la diversité virale, réduisant probablement les pressions de sélection sur chaque génotype et permettant la génération de diversité dans la population virale. La conséquence finale devrait être la réduction de la vitesse ou de la probabilité de génération de résistances de l'insecte contre les génotypes viraux. Combiner cette approche avec une coévolution temporelle des populations virales avec leurs hôtes devrait prévenir le développement de nouvelles résistances, faisant de la lutte biologique contre cet insecte une méthode de contrôle durable.

Nos données ne permettent pas de déterminer s'il y a co-infection des cellules par CpGV-M et CpGV-R5 et si cette étape est requise pour la réplication de CpGV-M dans un hôte résistant ou si, alternativement, un facteur diffusible est sécrété par les cellules infectées par CpGV-R5 rendant sensible à CpGV-M les cellules non-infectées. Si la co-infection est un mécanisme généralisé, comme chez les NPV (Bull *et al.*, 2001), davantage de variabilité pourrait être générée par la recombinaison.

Pour explorer plus en détails ces hypothèses, des productions successives de ces mélanges ont été réalisées sur larves sensibles et résistantes. Leur efficacité a été testée mais une analyse plus poussée des quantités de génomes produits a aussi été réalisée pour déterminer si un phénomène de recombinaison est possible chez les GV. Ces analyses sont décrites dans le chapitre suivant.

Partie 4 : Evolution expérimentale de 5 population virales mixtes

Chapitre 8. Evolution des mélanges viraux : tests d'efficacité et analyse des proportions de chaque génome après plusieurs passages sur larves de carpocapses sensibles et résistantes

Une partie de ce chapitre fera l'objet d'une publication actuellement en préparation : **Grillot, B., Bayle, S., Besse, S., Blachère Lopez, C., Siegwart, M. & Lopez-Ferber, M.** Successive passages of mixed CpGV populations converge to an optimal efficacy and produce recombination.

1. Introduction

Comme indiqué dans le chapitre précédent, la co-infection de cellules hôtes est un trait généralisé chez AcMNPV (Bull *et al.*, 2001) et les phénomènes de co-occlusion et de co-enveloppement ont été démontrés pour *Spodoptera frugiperda* Multiple Nucleopolyhedrovirus, SfMNPV (Lopez-Ferber *et al.*, 2003 ; Clavijo *et al.*, 2009).

Ces phénomènes de co-infection d'une même cellule et de recombinaison ont souvent été observés pour les NPV mais jamais pour les GV. Il est normal de ne pas rencontrer de co-encapsulation du fait même de la structure des GV mais il est difficile d'imaginer que deux GV ne pourraient pas coloniser la même cellule et s'y répliquer. Malgré quelques travaux ayant montré des phénomènes de recombinaison lors de l'infection de leur hôte, tant entre le génome de l'hôte et celui du virus (Ahrens & Jehle, 2002) ou entre génotypes différents du même virus, *Cryptoflebia leucotreta* granulovirus (Jehle *et al.*, 2003), l'étendue de ce phénomène de co-infection n'a été que peu étudiée.

Précédemment, nous avons étudié l'efficacité de mélanges en différentes proportions de deux isolats de CpGV - CpGV-M et CpGV-R5 - ainsi que la composition génétique de ces mélanges après production sur des larves de carpocapses sensibles et résistantes.

Ce travail a été poursuivi et tous les mélanges ont été produits pendant 6 générations sur larves sensibles (CpNPP) et résistantes (R_{GV}). Des tests d'efficacité de ces productions ont été

effectués sur larves CpNPP et R_{GV} ainsi qu'une quantification PCR de chaque génome à l'aide des marqueurs utilisés précédemment.

Ce système à 2 virus et 2 hôtes se présente comme un modèle pour une étude d'évolution expérimentale ; le virus ne rencontrant pas de coût apparent à contourner une résistance (voir [chapitre 4](#)) et l'hôte ne présentant pas de coût détectable non plus en développant une résistance (Undorf-Spahn *et al.*, 2012).

Ce travail a deux objectifs. Le premier consiste en un suivi de l'évolution de l'efficacité des mélanges viraux précédemment préparés en les produisant avec pression de sélection (sur insectes résistants) et sans pression de sélection (sur insectes sensibles), pour observer dans les deux cas l'effet de l'infection par un mélange de GV.

Le second objectif est de rechercher d'éventuels phénomènes de co-infection d'une même cellule par des GV, et de recombinaison.

Comme indiqué dans le chapitre précédent, il est impossible de conclure à un quelconque événement de recombinaison des deux virus après une production en utilisant seulement les marqueurs sélectionnés. En effet, il faut au moins deux marqueurs présentant une variabilité pour pouvoir établir des analyses de recombinaison. Un second marqueur variable a donc été trouvé, « CpGV-20400 », et deux oligonucléotides l'encadrant ont été désignés. En PCR quantitative, ce couple d'amorces amplifie une bande sur CpGV-R5 mais pas sur CpGV-M (voir [Chapitre 2, tableau 2.2](#)). Il a été décrit récemment que le contournement de la résistance par le virus était dû à une modification du gène *pe38*, matérialisée par une délétion de 24 pb dans le génome de CpGV-R5 par rapport à celui de CpGV-M (Gebhardt *et al.*, 2014). Il est impossible de créer des amorces spécifiques à l'un ou l'autre virus, comme réalisé précédemment, car la zone délétée chez CpGV-R5 est une zone répétée et donc également présente chez CpGV-M. Des amorces ont donc été créées dans la zone encadrant la délétion, de façon à amplifier un fragment de 275 ou 299 paires de bases selon le génome et visualiser ces 2 fragments sur gel d'agarose haute résolution.

Le plan des analyses effectuées dans ce chapitre est présenté dans la [figure 8.1](#).

2. Résultats

2.1. Tests d'efficacité

Des tests d'efficacité des différentes productions des mélanges viraux ont été effectués sur la colonie sensible (CpNPP) et la colonie résistance à CpGV-M (R_{GV}). Les résultats obtenus pour les mélanges ont été décrits dans le [chapitre 7](#) ([Tableau 7.2](#) et [Figure 7.1](#) à [7.4](#)). Ici, seule l'efficacité des productions successives de ces mélanges sera détaillée.

2.1.1. Efficacité des productions issues de larves sensibles CpNPP

Les résultats des tests biologiques des productions issues d'insectes sensibles effectués sur CpNPP sont décrits dans le [tableau 8.1](#) et la [figure 8.2](#). Ces tests indiquent un gain significatif d'efficacité au cours des générations pour atteindre l'efficacité de CpGV-M ($CL_{50}=13,10$ (6,55 - 23,2) ; $CL_{90}=223,1$ (110,7 - 654,18)) à la sixième génération des mélanges M99-1 ($CL_{50}=13,87$ (6,24 - 26,43) ; $CL_{90}=187,03$ (86,12 - 701,04)), M50-R50 ($CL_{50}=23,29$ (16,2 - 32,87) ; $CL_{90}=264,25$ (164,49 - 500,59)) et M10-R90 ($CL_{50}=29,94$ (8,32 - 66,24) ; $CL_{90}=322,97$ (118,86 - $2,83 \times 10^3$)) et l'efficacité de CpGV-R5 ($CL_{50}=6,76$ (2,6 - 13,37) ; $CL_{90}=59,63$ (27,54 - 278,55)) à la sixième génération des mélanges M95-R05 ($CL_{50}=8,19$ (4,91 - 14,39); $CL_{90}=91,48$ (45,43 - 308,42)) et M90-R10 ($CL_{50}=10,5$ (6,03 - 16,51) ; $CL_{90}=62,35$ (36,43 - 153,32)).

Tableau 8.1. Pathogénicités, mesurées par CL₅₀ et CL₉₀, des 6 productions successives sur larves sensibles CpNPP de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensibles au virus (CpNPP).

Colonie d'insecte	Isolats viraux	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/μL (95% IC)		Pente ± ES	χ ²
			CL ₅₀	CL ₉₀		
CpNPP	G1 ₉₉₋₀₁	462	29,39 (20,82-40,34)	169,90 (113,94-296,54)	1,68 ± 0,19	2,82
	G1 ₉₅₋₀₅	483	111,56 (75,32-151,5)	517,84 (355,75-949,06)	1,92 ± 0,30	3,88
	G1 ₉₀₋₁₀	484	74,92 (52,36-105,25)	601,38 (387,26-1,09 × 10 ³)	1,42 ± 0,14	3,07
	G1 ₅₀₋₅₀	513	26,27 (17,71-35,71)	99,98 (69,99-175,41)	2,21 ± 0,35	3,32
	G1 ₁₀₋₉₀	466	95,44 (63,85-137,87)	1,03 × 10 ³ (633,7-1,98 × 10 ³)	1,24 ± 0,13	1,58
G2	G2 ₉₉₋₀₁	522	27,13 (19,23-37,16)	161,60 (109,02-277,58)	1,65 ± 0,18	1,41
	G2 ₉₅₋₀₅	522	24,67 (16,75-35,01)	210,94 (135,08-387,99)	1,38 ± 0,15	1,05
	G2 ₉₀₋₁₀	510	27 (12,21-43,45)	124,96 (72,69-436,92)	1,93 ± 0,33	4,51
	G2 ₅₀₋₅₀	664	26,86 (12,80-49,02)	289,75 (143,86-896,56)	1,24 ± 0,11	7,04
	G2 ₁₀₋₉₀	515	26,84 (18,27-38,06)	231,7 (148,57-424,23)	1,37 ± 0,15	1,34
G3	G3 ₉₉₋₀₁	457	37,31 (10,15-87,995)	389,45 (152,89-3,19 × 10 ³)	1,26 ± 0,14	10,43
	G3 ₉₅₋₀₅	439	51,26 (14,83-98,80)	299,35 (146,67-2,12 × 10 ³)	1,67 ± 0,25	7,66
	G3 ₉₀₋₁₀	422	56,89 (39,56-78,86)	381,39 (253,29-670,43)	1,55 ± 0,17	2,19
	G3 ₅₀₋₅₀	679	29,04 (6,62-73,92)	421,37 (152,65-3,75 × 10 ³)	1,10 ± 0,11	13,48
	G3 ₁₀₋₉₀	433	57,8 (31,98-100,45)	384,34 (200,95-1,14 × 10 ³)	1,56 ± 0,15	6,26
G4	G4 ₉₉₋₀₁	559	29,82 (19,16-45,23)	319,86 (185,03-695,23)	1,24 ± 0,12	11,73
	G4 ₉₅₋₀₅	525	38,99 (28,37-53,16)	270,33 (178,82-472,22)	1,52 ± 0,15	2,94
	G4 ₉₀₋₁₀	532	36,24 (15,99-75,03)	405,74 (172,58-1,91 × 10 ³)	1,22 ± 0,12	8,03
	G4 ₅₀₋₅₀	811	61,39 (41,04-89,71)	680 (412,56-1,34 × 10 ³)	1,23 ± 0,1	13,63
	G4 ₁₀₋₉₀	520	57,49 (37,83-85,12)	328,73 (200,66-705,88)	1,69 ± 0,18	13,41
G5	G5 ₉₉₋₀₁	556	28,63 (13,18-51,92)	198,81 (100,72-720,93)	1,52 ± 0,18	25,11
	G5 ₉₅₋₀₅	522	25,32 (15,85-39,48)	415,20 (236,28-866,72)	1,06 ± 0,1	1,74
	G5 ₉₀₋₁₀	544	48,78 (34,11-67,86)	383,56 (251,06-679,28)	1,43 ± 0,15	9,23
	G5 ₅₀₋₅₀	553	41,59 (24,63-67,81)	313,61 (172,10-803,49)	1,46 ± 0,14	18,13
	G5 ₁₀₋₉₀	464	45,60 (18,87-89,29)	397,11 (184,46-1,73 × 10 ³)	1,36 ± 0,15	28,94
G6	G6 ₉₉₋₀₁	536	13,87 (6,24-26,43)	187,03 (86,12-701,04)	1,13 ± 0,12	22,86
	G6 ₉₅₋₀₅	502	8,19 (4,91-14,39)	91,48 (45,43-308,42)	1,22 ± 0,14	4,99
	G6 ₉₀₋₁₀	786	10,50 (6,03-16,51)	62,35 (36,43-153,32)	1,66 ± 0,17	22,53
	G6 ₅₀₋₅₀	531	23,29 (16,20-32,87)	264,25 (164,49-500,59)	1,22 ± 0,12	2,42
	G6 ₁₀₋₉₀	773	26,94 (8,32-66,24)	322,97 (118,86-2,82 × 10 ³)	1,19 ± 0,10	16,59

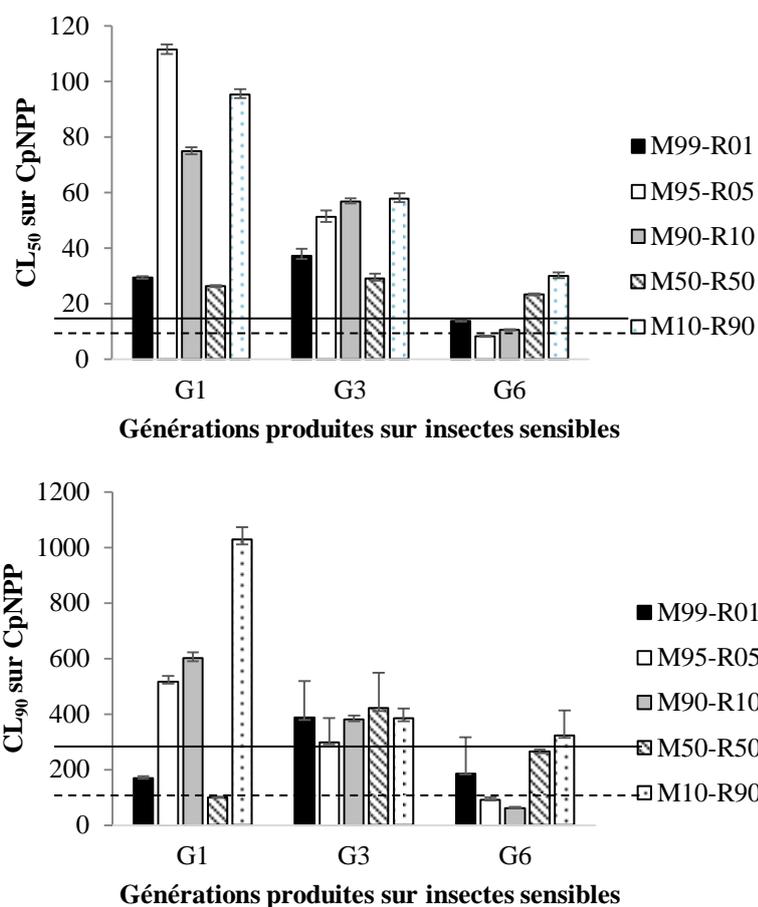


Figure 8.2. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) sur CpNPP des différents mélanges viraux produits sur larves sensibles. La ligne pleine indique l'efficacité de CpGV-M et la ligne pointillée indique l'efficacité de CpGV-R5.

Les résultats des tests sur larves résistantes de ces productions issues d'individus sensibles sont présentés dans le [tableau 8.2](#) et la [figure 8.3](#). Ces résultats indiquent que les efficacités des générations G1 à G3 sont similaires à celles de CpGV-R5 sur R_{GV} voire meilleures. L'efficacité des générations G4 et G5 est assez fluctuante. Par contre, toutes les générations 6 atteignent au moins l'efficacité de CpGV-R5 sur R_{GV}. Seule la G6 M50-R50 a une efficacité égale à celle de CpGV-R5 seul sur R_{GV} (CL₅₀=38,68 (24,58 - 56,4) ; CL₉₀=462,4 (299,93 - 817,65)), alors que toutes les autres G6 atteignent une efficacité supérieure à celle de CpGV-R5 seul (G6 M99-R1 : CL₅₀=40,89 (7,43 - 109,24) CL₉₀=294,64 (110,16 - 4,08 × 10³); G6 M95-R05 : CL₅₀=36,37 (17,34 - 68,13) CL₉₀=270,31 (135,55 - 853,78) ; G6 M90-R10 : CL₅₀=30,3 (15,77 - 50,36) CL₉₀=319,71 (179,35 - 761,25) ; G6 M10-R90 : CL₅₀=28,24 (19,32 - 38,32) CL₉₀=164,1 (115,26 - 269,16)).

Tableau 8.2. Pathogénicités, mesurées par CL₅₀ et CL₉₀, des 6 productions successives sur larves sensibles (CpNPP) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* résistantes au virus (R_{GV}).

Colonie d'insecte	Isolats viraux	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/μL (95% IC)		Pente ± ES	χ ²
			CL ₅₀	CL ₉₀		
R _{GV}	G1 ₉₉₋₀₁	414	176,36 (114,60-249,42)	966,71 (640,27-1,8 × 10 ³)	1,73 ± 0,25	8,75
	G1 ₉₅₋₀₅	561	53,1 (33,81-76,56)	441,66 (288,69-798,88)	1,39 ± 0,17	3,21
	G1 ₉₀₋₁₀	689	54,74 (16,05-110,85)	364,35 (171,26-2,17 × 10 ³)	1,56 ± 0,25	3,26
	G1 ₅₀₋₅₀	460	127,15 (36,73-247,60)	1,09 × 10 ³ (524,49-5,94 × 10 ³)	1,37 ± 0,20	6,23
	G1 ₁₀₋₉₀	458	36,60 (14,75-67,33)	331,21 (168,91-1,11 × 10 ³)	1,34 ± 0,17	5,21
	G2 ₉₉₋₀₁	461	107,29 (70,46-154,06)	869,17 (559,54-1,6 × 10 ³)	1,41 ± 0,16	0,80
	G2 ₉₅₋₀₅	451	23,14 (16,27-32,40)	229,20 (145,36-422,12)	1,29 ± 0,13	2,41
	G2 ₉₀₋₁₀	445	106,86 (20,85-236,98)	974,39 (435,56-5,41 × 10 ³)	1,34 ± 0,20	3,84
	G2 ₅₀₋₅₀	447	88,41 (57,73-130,36)	1,10 × 10 ³ (671,47-2,15 × 10 ³)	1,17 ± 0,12	2,314
	G2 ₁₀₋₉₀	442	60,96 (21,58-102,79)	300,67 (175,19-963,57)	1,85 ± 0,34	4,04
	G3 ₉₉₋₀₁	458	122,99 (87,41-165,19)	583,23 (403,96-999,21)	1,90 ± 0,25	5,77
	G3 ₉₅₋₀₅	453	38,35 (10,23-90,29)	755,96 (290,91-4,76 × 10 ³)	0,99 ± 0,12	6,71
	G3 ₉₀₋₁₀	454	27,15 (10,40-57,76)	1,09 × 10 ³ (418,79-5,47 × 10 ³)	0,80 ± 0,08	19,06
	G3 ₅₀₋₅₀	441	44,00 (20,26-83,33)	833,73 (384,75-2,79 × 10 ³)	1,00 ± 0,10	4,33
	G3 ₁₀₋₉₀	427	39,14 (25,28-56,84)	280,60 (180,78-516,94)	1,50 ± 0,18	0,87
	G4 ₉₉₋₀₁	444	50,21 (32,72-73,10)	445,61 (282,68-826,83)	1,35 ± 0,15	1,81
	G4 ₉₅₋₀₅	435	47,75 (30,85-68,93)	358,88 (232,40-658,43)	1,46 ± 0,18	1,56
	G4 ₉₀₋₁₀	423	43,26 (16,6-92,20)	718,57 (300,57-3,11 × 10 ³)	1,05 ± 0,11	6,13
	G4 ₅₀₋₅₀	447	91,79 (45,09-163,16)	1,08 × 10 ³ (546,3-3,17 × 10 ³)	1,20 ± 0,13	4,18
	G4 ₁₀₋₉₀	439	108,68 (44,19-203,11)	856,34 (428,82-3,07 × 10 ³)	1,43 ± 0,19	20,27
	G5 ₉₉₋₀₁	611	243,29 (114,99-389,52)	2,19 × 10 ³ (1,37 × 10 ³ -4,7 × 10 ³)	1,34 ± 0,23	0,53
	G5 ₉₅₋₀₅	881	255,51 (191,31-328,77)	1,77 × 10 ³ (1,28 × 10 ³ -2,7 × 10 ³)	1,53 ± 0,15	4
	G5 ₉₀₋₁₀	409	57,97 (26,99-105,60)	616,17 (311,53-1,82 × 10 ³)	1,25 ± 0,14	4,15
	G5 ₅₀₋₅₀	440	67,40 (43,18-95,49)	402,08 (268,71-728,60)	1,65 ± 0,23	2,20
	G5 ₁₀₋₉₀	691	138,92 (36,96-279,96)	1,16 × 10 ³ (544,98-6,69 × 10 ³)	1,39 ± 0,17	9,91
	G6 ₉₉₋₀₁	448	40,89 (7,43-109,24)	294,64 (110,16-4,08 × 10 ³)	1,49 ± 0,19	7,20
	G6 ₉₅₋₀₅	643	36,67 (17,34-68,13)	270,31 (135,55-853,78)	1,48 ± 0,14	7,82
	G6 ₉₀₋₁₀	886	30,30 (15,77-50,36)	319,71 (179,35-761,25)	1,25 ± 0,11	5,95
	G6 ₅₀₋₅₀	619	38,68 (24,58-56,40)	462,40 (299,93-817,65)	1,19 ± 0,12	3,93
	G6 ₁₀₋₉₀	636	28,24 (19,32-38,32)	164,10 (115,26-269,16)	1,68 ± 0,21	1,14

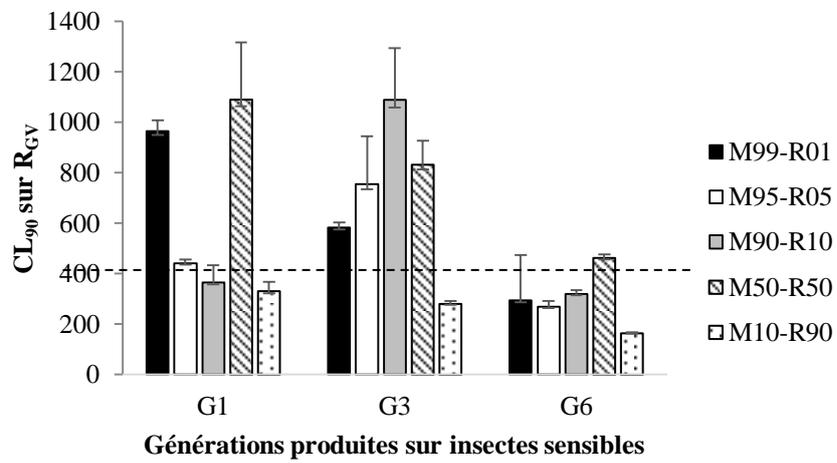
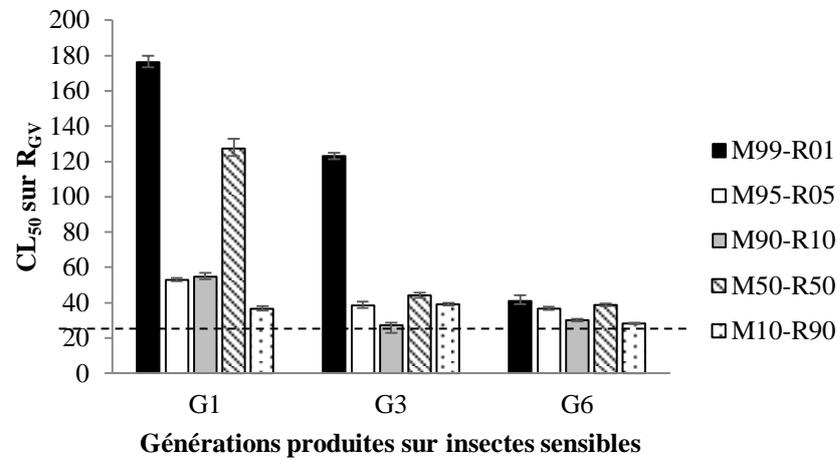


Figure 8.3. Efficacité (CL_{50} et CL_{90}) sur R_{GV} des différents mélanges viraux produits sur larves sensibles. La ligne pointillée indique l'efficacité de CpGV-R5.

Les sixièmes générations de tous les mélanges produits sur CpNPP sont capables de contrôler aussi bien les insectes sensibles que les insectes résistants et cela aussi bien que CpGV-R5.

2.1.2. Efficacité des productions issues de larves résistantes R_{GV}

Les résultats des tests biologiques sur des insectes sensibles CpNPP des productions issues de la colonie R_{GV} sont décrits dans le [tableau 8.3](#) et la [figure 8.4](#).

Tableau 8.3. Pathogénicités, mesurées par CL_{50} et CL_{90} , des 6 productions successives sur larves résistantes (R_{GV}) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* sensibles (CpNPP).

Colonie d'insecte	Isolats viraux	Nb. d'insectes testés	Nb. d'OB/ μ L (95% IC)		Pente \pm ES	χ^2
			LC_{50}	LC_{90}		
CpNPP	G1 ₉₉₋₀₁	492	80,73 (28,60 - 173,25)	384,19 (178,01 - $2,88 \times 10^3$)	$1,89 \pm 0,23$	11,25
	G1 ₉₅₋₀₅	493	53,80 (37,90 - 72,88)	270,97 (186,45 - 463,82)	$1,83 \pm 0,23$	1,57
	G1 ₉₀₋₁₀	546	92,64 (44,60 - 160,48)	830,02 (435,03 - $2,55 \times 10^3$)	$1,35 \pm 0,16$	4,69
	G1 ₅₀₋₅₀	501	62,46 (29,03 - 110,94)	525,17 (267,52 - $1,81 \times 10^3$)	$1,39 \pm 0,16$	5,55
	G1 ₁₀₋₉₀	490	89,41 (57,34 - 129,24)	725,97 (459,08 - $1,42 \times 10^3$)	$1,41 \pm 0,18$	3,05
	G3 ₉₉₋₀₁	455	42,28 (15,82 - 74,19)	301,06 (160 - $1,19 \times 10^3$)	$1,50 \pm 0,25$	4,37
	G3 ₉₅₋₀₅	441	45,26 (14,40 - 103,25)	251,81 (109,21 - $2,02 \times 10^3$)	$1,72 \pm 0,20$	11,85
	G3 ₉₀₋₁₀	479	42,30 (8,55 - 105,98)	255,15 (102,49 - $4,08 \times 10^3$)	$1,64 \pm 0,21$	7,56
	G3 ₅₀₋₅₀	497	61,30 (40,20 - 90,63)	$1,05 \times 10^3$ (622,78 - $2,07 \times 10^3$)	$1,04 \pm 0,1$	2,97
	G3 ₁₀₋₉₀	492	32,28 (5,34 - 75,45)	310,82 (127,4 - $3,17 \times 10^3$)	$1,30 \pm 0,18$	9,03
G6 ₉₉₋₀₁	549	72,03 (42,30 - 109,63)	324,20 (197,90 - 796,16)	$1,96 \pm 0,27$	4,16	
G6 ₉₅₋₀₅	501	17,92 (5,62 - 42,66)	244,13 (91,42 - $1,87 \times 10^3$)	$1,13 \pm 0,12$	9,78	
G6 ₉₀₋₁₀	487	53,10 (38,43 - 72,49)	398,32 (264,37 - 685,78)	$1,46 \pm 0,14$	2,79	
G6 ₅₀₋₅₀	556	41,29 (29,49 - 55,70)	226,32 (154,83 - 387,75)	$1,73 \pm 0,21$	0,75	
G6 ₁₀₋₉₀	497	41,01 (18,97 - 72,55)	347,49 (176,56 - $1,24 \times 10^3$)	$1,38 \pm 0,17$	5,12	

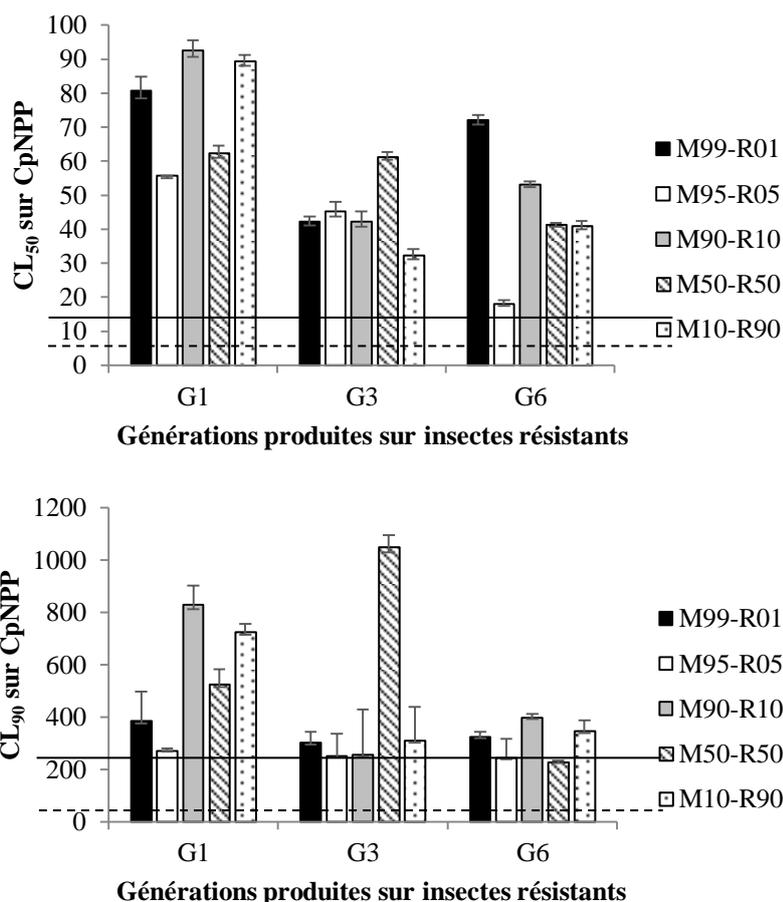


Figure 8.4. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) sur CpNPP des différents mélanges viraux produits sur larves résistantes. La ligne pleine indique l'efficacité de CpGV-M et la ligne pointillée indique l'efficacité de CpGV-R5.

Les résultats sont ici moins clairs que pour les virus produits sur larves sensibles. L'efficacité de ces productions sur insectes résistants indique une CL₅₀ plus forte que celles obtenues avec CpGV-M et CpGV-R5 sur larves sensibles, excepté pour la G6 M95-R05 (17,92 (5,62 - 42,66)) atteignant l'efficacité de CpGV-M. Pour la CL₉₀, à partir de la G3, toutes les productions développent la même efficacité que CpGV-M sur populations sensibles, excepté la G3 50-50.

Les résultats des tests de ces productions effectuées sur R_{GV} sont détaillés dans le [tableau 8.4](#) et la [figure 8.5](#).

Tableau 8.4. Pathogénicité, mesurées par CL₅₀ et CL₉₀, des 6 productions successives sur larves résistantes (R_{GV}) de 5 mélanges viraux sur des colonies de laboratoire de *C. pomonella* résistantes au virus (R_{GV}).

Colonie d'insecte	Isolats Viraux	Nb. D'insectes testés	Nb. d'OBS/μL (95% IC)		Pente ± SE	χ ²
			LC ₅₀	LC ₉₀		
R_{GV}	G1₉₉₋₀₁	433	117,65 (79,23 - 160,55)	488,61 (337,25 - 881,23)	2,07 ± 0,33	2,12
	G1₉₅₋₀₅	435	109,32 (78,24 - 142,61)	318,6 (234,56 - 519,12)	2,76 ± 0,46	1,12
	G1₉₀₋₁₀	438	186,77 (122,06 - 266,24)	1,26 × 10 ³ (819,53 - 2,35 × 10 ³)	1,55 ± 0,20	1,25
	G1₅₀₋₅₀	447	129,62 (47,43 - 226,93)	870,54 (480,27 - 2,88 × 10 ³)	1,55 ± 0,25	4,35
	G1₁₀₋₉₀	435	71,97 (31,00 - 132,42)	661,67 (332,50 - 2,21 × 10 ³)	1,33 ± 0,17	4,82
	G3₉₉₋₀₁	466	56,11 (35,52 - 79,78)	288,54 (192,91 - 532,54)	1,80 ± 0,27	0,90
	G3₉₅₋₀₅	449	60,87 (41,00 - 84,37)	352,54 (236,84 - 632,27)	1,68 ± 0,22	2,83
	G3₉₀₋₁₀	441	33,03 (6,48 - 90,35)	231,40 (85,70 - 6,39 × 10 ³)	1,52 ± 0,19	15,08
	G3₅₀₋₅₀	689	81,35 (26,67 - 148,92)	587,06 (306,58 - 2,37 × 10 ³)	1,49 ± 0,19	7,95
	G3₁₀₋₉₀	447	43,99 (22,69 - 77,06)	345,12 (176,65 - 1,12 × 10 ³)	1,43 ± 0,16	5,45
	G6₉₉₋₀₁	427	116,10 (76,37 - 164,80)	728,27 (479,14 - 1,33 × 10 ³)	1,61 ± 0,21	1,80
	G6₉₅₋₀₅	439	41,82 (22,12- 65,15)	368,98 (230,50 - 752,33)	1,36 ± 0,21	2,90
	G6₉₀₋₁₀	813	186,46 (102,88 - 267,37)	912,73 (555,33 - 3,13 × 10 ³)	1,86 ± 0,30	15,316
	G6₅₀₋₅₀	470	58,22 (16,51 - 128,09)	826,35 (353,57 - 4,04 × 10 ³)	1,11 ± 0,15	5,68
	G6₁₀₋₉₀	690	48,26 (31,23 - 69,48)	547,61 (357,09 - 966,13)	1,22 ± 0,13	2,68

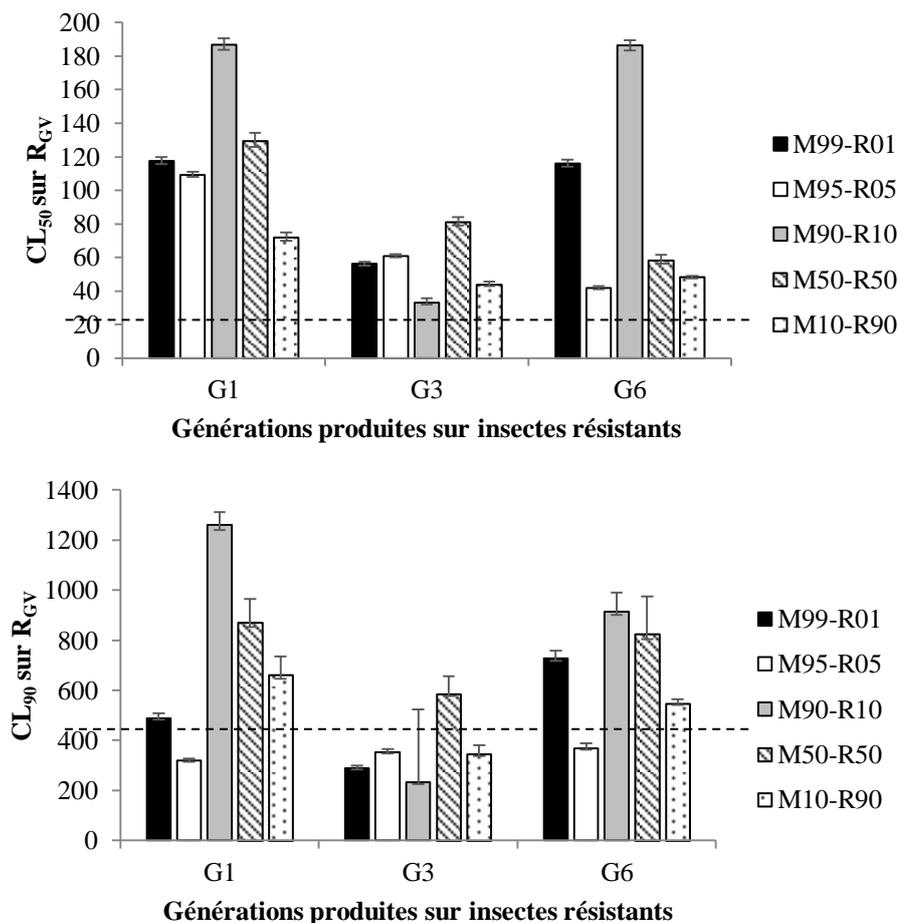


Figure 8.5. Efficacité (CL₅₀ et CL₉₀) sur R_{GV} des différents mélanges viraux produits sur larves résistantes. La ligne pointillée indique l'efficacité de CpGV-R5.

L'efficacité sur larves résistantes R_{GV} des productions issues d'insectes résistants présente une forte variabilité. Toutes les productions de 3^{ème} génération montrent une bonne efficacité (G3 M99-R01 : CL₅₀=56,11 (35,52 - 79,78) CL₉₀=288,54 (192,91 - 532,54) ; G3 M95-R05: CL₅₀=60,87 (41 - 84,37) CL₉₀=352,54 (236,84 - 632,27) ; G3 M90-R10: CL₅₀=33,03 (6,48 - 90,35) CL₉₀=231,4 (85,7 - 6,39 × 10³) ; G3 M50-R50: CL₅₀=81,35 (26,67 - 148,92) CL₉₀=587,06 (306,58 - 2,37 × 10³) ; G3 M10-R90: CL₅₀=43,99 (22,69 - 77,06) CL₉₀ 345,12 (176,65 - 1,12 × 10³). Par contre, seule la G6 M95-R05 est capable de contrôler les larves R_{GV} (CL₅₀=41,82 (22,12 - 65,15) CL₉₀=368,98 (230,5 - 752,33), les autres présentant une efficacité plutôt mauvaise.

2.2. Analyse de la proportion de marqueurs de chaque génome par PCRq

Une analyse par PCR quantitative a été effectuée sur les productions des différents mélanges issus d'insectes sensibles et résistants. Ces résultats sont présentés dans les [tableaux 8.5 à 8.8](#).

La PCR a révélé que les marqueurs de chacun des virus étaient présents dans l'intégralité des productions issues d'insectes sensibles ([tableau 8.5 et 8.7](#)). Ce résultat est attendu, les deux virus étant capables d'infecter l'hôte et de s'y multiplier.

Tableau 8.5. Pourcentages d'allèles provenant de CpGV-M sur le marqueur « CpGV-15600 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 (en bleu) » et de CpGV-R5 par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit (en noir) dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves sensibles CpNPP.

Génération	M99-R01		M95-R05		M90-R10		M50-R50		M10-R90	
	%M	%R								
0	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90
1	25	75	76	24	35	65	52	48	1	99
2	18	82	86	14	31	69	56	48	23	77
3	16	84	80	20	40	60	66	34	16	84
4	15	85	87	23	55	45	30	70	44	56
5	7	93	87	23	89	11	32	68	39	61
6	4	96	66	34	72	28	46	54	17	83

Les tests de quantification par PCR sur les productions de mélanges issues d'insectes résistants ([Tableau 8.6 et 8.8](#)), mettent en évidence une répllication effective de CpGV-M dans des individus résistants grâce à la présence de CpGV-R5 ([Chapitre 7](#)). Par ailleurs, ils indiquent aussi que seuls des marqueurs de CpGV-R5 sont retrouvés dans certaines production. En effet, il n'y a présence d'aucun marqueur de CpGV-M à partir de la G4 du mélange M99-R01 et de la G3 du mélange M90-R10. Comme constaté pour les productions successives des mélanges sur insectes permissifs, les proportions sont très variables et n'égalent jamais 100% de CpGV détecté : la somme des pourcentages de marqueurs excède même parfois les 100%.

Tableau 8.6. Pourcentages d'allèles provenant de CpGV-M sur le marqueur « CpGV-15600 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » (en bleu) et de CpGV-R5 par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit (en noir) dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves résistantes R_{GV}.

Génération	M99-R01		M95-R05		M90-R10		M50-R50		M10-R90	
	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R
0	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90
1	121	0	114	0	42	58	38	62	43	57
2	44	56	51	49	2	98	7	93	69	38
3	12	88	30	70	0	100	2	98	39	61
4	0	100	45	55	0	100	7	93	10	90
5	0	100	49	51	0	100	9	91	13	87
6	0	100	36	64	0	100	4	96	6	94

Tableau 8.7. Pourcentages d'allèles provenant de CpGV-R5 sur le marqueur « CpGV-20400 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » (en bleu) et de CpGV-M par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit (en noir) dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves sensibles CpNPP.

Génération	M99-R01		M95-R05		M90-R10		M50-R50		M10-R90	
	%M	%R								
0	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90
1	70	30	87	13	86	14	79	21	53	47
2	57	43	85	15	87	13	78	22	64	36
3	48	52	81	19	84	16	79	21	65	35
4	60	40	86	14	75	25	76	24	85	15
5	71	29	87	13	75	25	80	20	80	20
6	69	31	92	8	72	28	81	19	75	25

Tableau 8.8. Pourcentages d'allèles provenant de CpGV-R5 sur le marqueur « CpGV-20400 » par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 » (en bleu) et de CpGV-M par rapport au marqueur commun « CpGV-138300 », déduit (en noir) dans les différents mélanges viraux et dans leurs productions successives sur larves résistantes R_{GV}.

Génération	M99-R01		M95-R05		M90-R10		M50-R50		M10-R90	
	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R
0	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90
1	84	16	99	1	71	29	47	53	53	47
2	57	43	92	8	9	91	19	81	58	42
3	55	45	93	7	18	82	0	113	49	51
4	16	84	85	15	13	87	17	83	0	105
5	12	88	82	18	12	88	15	85	0	105
6	16	84	91	9	16	84	21	79	0	105

Ces résultats semblent donner un premier indice sur une probable co-infection de cellules par deux GV et une possible recombinaison des génomes. Les marqueurs « CpGV-15600 » et « CpGV-20400 » ne sont pas, à notre connaissance, impliqués dans le phénomène de résistance, et donc, ne doivent pas être soumis à sélection.

Il est possible d'observer des variations dans les fréquences relatives de chaque allèle au cours des passages successifs : cela implique une recombinaison entre les deux marqueurs. Dans quelques cas, une proportion de 100% est observée dans une génération, non confirmée dans les suivantes. Cela ne peut indiquer qu'une présence d'un des allèles en-dessous de la limite de détection de la PCR. Par contre, dans certaines lignées, il y a fixation d'un des marqueurs (proportion de 100%). Seuls des allèles provenant de CpGV-R5 sont fixés lors de l'amplification sur R_{GV}, indépendamment de la proportion d'origine de CpGV-R5 (Tableau 8.6 et 8.8). Cela arrive seulement dans les lignées amplifiées sur l'hôte résistant, R_{GV}, mais pas celles amplifiées sur CpNPP. Cette différence d'évolution ne peut être due qu'à des « effets de fondateur ». En effet, chaque larve dans nos conditions d'infection, n'ingère que quelques OB, impliquant des forts goulots d'étranglement dans la population virale. Il est possible de supposer que la présence d'une pression de sélection pour l'allèle viral « résistant » du gène *pe38* accroît ces effets par des actions de liaison génétique, les trois gènes étant dans la même molécule physique. Il est difficile de calculer une distance

génétique en « Morgan », car le résultant de chaque évènement ne peut être isolé. La distance entre le marqueur CpGV-18800 localisé dans le gène *pe38*, soumis à sélection, et les autres marqueurs est indiquée dans le [Tableau 8.9](#). Une seule lignée a fixé l'allèle R du marqueur 20400 ([Tableau 8.8](#)), tandis que deux lignées ont fixé l'allèle R du marqueur CpGV-15600, même si la distance avec *pe38* est plus grande.

Tableau 8.9. Distances en nucléotides entre les marqueurs utilisés. Dans la partie supérieure droite, dans le sens horaire du génome. Dans la partie inférieure gauche, dans le sens antihoraire du génome. La taille considérée est celle du CpGV-M publiée par Luque *et al.* (2001).

Marqueurs	15600	18800	20400
15600		3200	4800
18800	120300		1600
20400	118700	121900	

2.3. Quantification de marqueurs *pe38* sur les différentes productions de mélanges : comparaison avec les résultats précédemment obtenus

Dans le but de compléter les résultats précédemment obtenus par PCR quantitative sur les productions de mélanges, une analyse par PCR a été effectuée avec des marqueurs permettant de différencier CpGV-M et CpGV-R5 dans la zone de *pe38*, codant pour le contournement de la résistance (Gebhardt, 2014). En effet, une différence de 24 pb entre ces deux virus serait une des clefs du contournement de la résistance par le virus. Nous avons développé un couple d'oligonucléotides entourant cette zone (marqueur « CpGV-18800 »).

Une analyse a tout d'abord été effectuée pour vérifier que la différence de taille était visualisable en gel d'agarose Cette analyse est présentée dans la [figure 8.6](#).

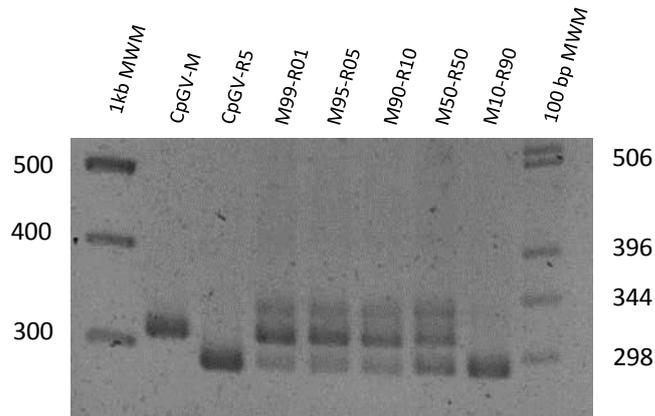


Figure 8.6. Différenciation de CpGV-M et CpGV-R5 ainsi que des 5 mélanges viraux d'origine grâce aux primers *pe38*

La différenciation des deux génomes apparait clairement sur le gel. Il est donc possible de différencier les génomes des deux virus sur la zone de *pe38*. L'analyse révèle également qu'une quantification des deux génomes est possible dans les mélanges viraux avec ce marqueur. Cette quantification est difficile pour des proportions très proches comme vu sur la [figure 8.6](#) pour les mélanges M99-R01 et M95-R05 où il est presque impossible de différencier 99% et 95% de CpGV-M ainsi que 1% et 5% de CpGV-R5. Les différences entre le mélange M99-R01, M90-R10, M50-R50 et M10-R90 sont, par contre, très facilement évaluables. Il est donc possible de quantifier ces deux génomes avec une précision d'environ 10%.

Cette méthode a donc été utilisée pour quantifier les deux génomes dans les productions de mélanges viraux issues de CpNPP ([Figure 8.7](#)).

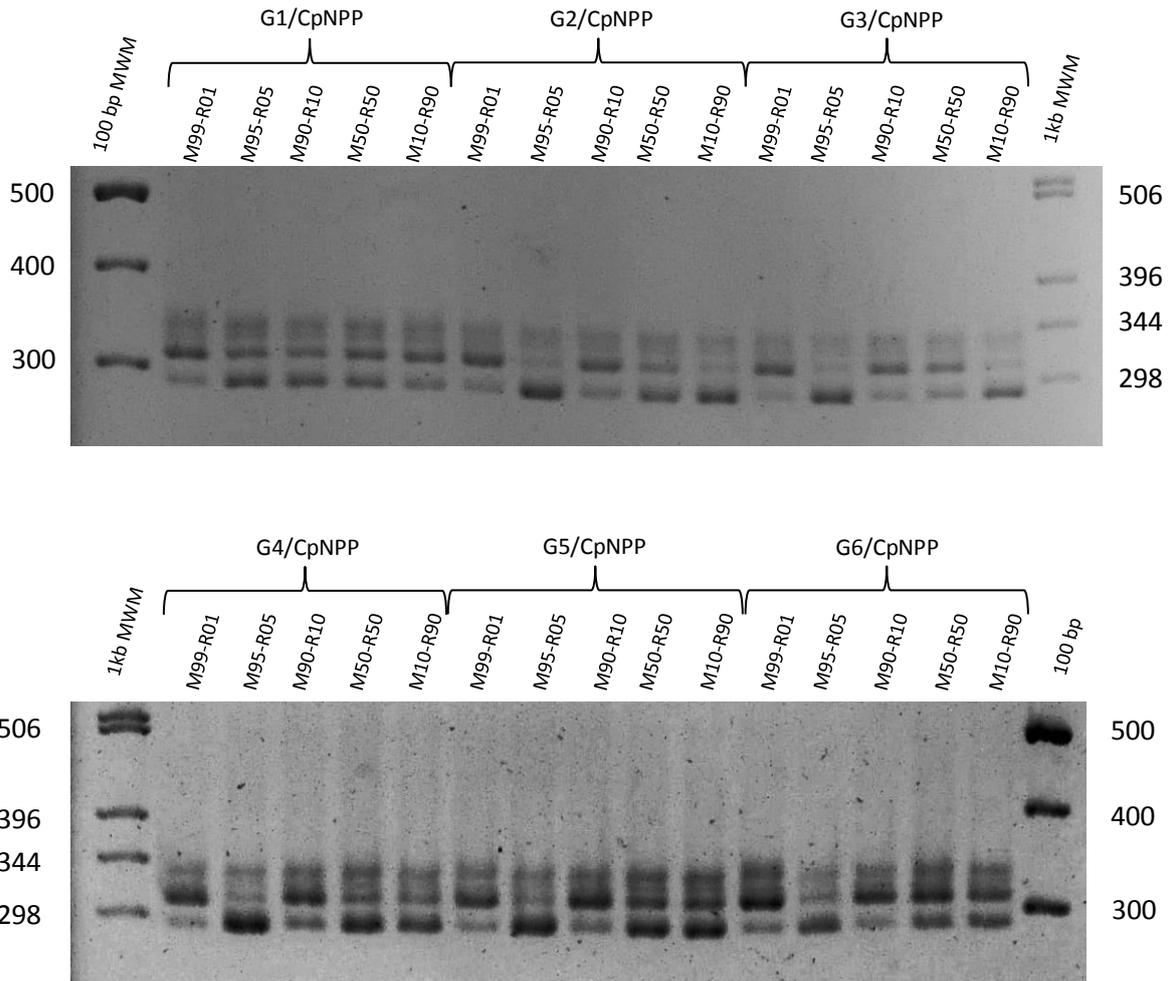


Figure 8.7. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 grâce au marqueur « CpGV-18800 » localisé dans le gène *pe38* pour les différentes productions des mélanges viraux issues de larves sensibles CpNPP.

L'analyse effectuée sur les productions de mélange issues de larves permissives, donc sans pression de sélection, révèle des différences de proportions de génomes de CpGV-M et CpGV-R5 dans la zone *pe38* et dans les zones précédemment étudiées par PCR quantitative. A part quelques exceptions, la totalité des proportions obtenues avec le marqueur CpGV-18800 sont différentes de celles précédemment obtenues, confirmant des événements de recombinaison des virus au cours des générations. De nouvelles bandes d'environ 350 pb sont aussi obtenues à partir de la 4^{ème} génération. Il pourrait s'agir de nouvelles formes de *pe38* obtenues par duplication de ces régions répétées.

La même analyse a été effectuée avec les productions successives de mélanges issues de larves résistantes et ayant donc subi une pression de sélection (Figure 8.8).

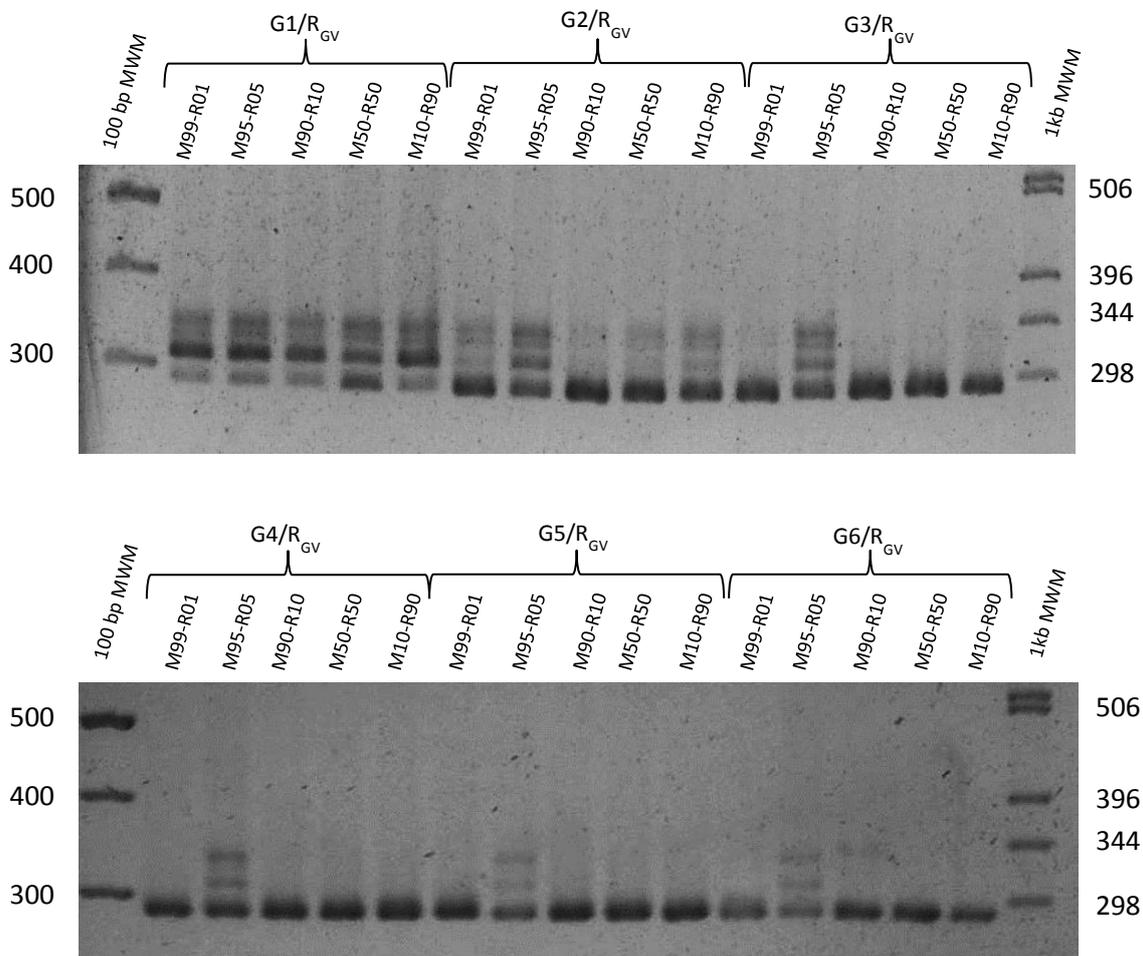


Figure 8.8. Analyse des proportions des génomes de CpGV-M et CpGV-R5 grâce au marqueur « CpGV-18800 » localisé dans le gène *pe38* pour les différentes productions des mélanges viraux issues de larves résistantes R_{GV}.

Lors de productions des mélanges sur insectes résistants, les deux génomes sont retrouvés sur les générations 1 et 2 sauf pour le mélange M95-R05 dans lequel le génome de CpGV-M disparaît complètement à partir de la génération 2. A partir de la génération 3, aucun marqueur de CpGV-M n'est retrouvé dans les productions de mélanges sauf pour M95-R05 où les deux marqueurs sont toujours présents. La tendance à la recombinaison est retrouvée comme dans les productions sur insectes sensibles avec des bandes d'environ 350 pb apparaissant à partir de la génération 4 de certains mélanges, et notamment M95-R05 où la présence de l'allèle M a été maintenue. Il est intéressant de noter qu'une bande d'environ 350

pb apparait clairement dans les productions du mélange M95-R05 indiquant une possible réorganisation par duplication de cette zone répétée dans les productions successives de ce mélange. La proportion de marqueurs semble concorder avec ce qui avait été obtenu précédemment par PCR quantitative, sauf pour le mélange M10-R90 dans lequel un maintien important du génome de CpGV-M dans les 3 premières générations est obtenu alors que l'analyse du gène *pe38* indique clairement un disparition totale du génome de CpGV-M après la seconde génération.

3. Discussion

L'analyse d'efficacité des différentes productions de mélanges issues d'insectes sensibles a montré un gain d'efficacité au fur et à mesure des générations pour atteindre une efficacité optimale à la 6^{ème} génération. Dans cette dernière, l'efficacité atteint celle de l'isolat CpGV-M sur larves sensibles et de l'isolat CpGV-R5 sur larves résistantes. L'efficacité des productions issues de larves R_{GV} est, par contre, moins convaincante. Alors que ces productions permettent un contrôle satisfaisant de la colonie sensible, une seule génération de mélange égale l'efficacité de CpGV-R5 à chaque génération (M95-R05). Les autres possèdent une efficacité satisfaisante pour la G3 mais une moins bonne efficacité pour la G6. Il semble que produire ces mélanges avec une forte pression de sélection joue en défaveur de l'efficacité.

L'étude de ces mélanges par PCR quantitative conforte les résultats décrits dans le [chapitre 7](#) Sur les productions des mélanges issues d'insectes sensibles, les deux marqueurs sont retrouvés dans tous les mélanges, et, ce, de la G1 à la G6. Les proportions sont par contre très fluctuantes et semblent, pour les deux mélanges extrêmes M99-R01 et M10-R90, sélectionner le génome de CpGV-R5 alors que le génome de CpGV-M semble être sélectionné pour les trois autres. Malgré cela, aucun des génomes ne disparaît. Lorsque ces mélanges sont, par contre, produits sur l'hôte non-permissif, la proportion s'inverse. Comme démontré précédemment, CpGV-M est capable de se répliquer dans un hôte résistant en présence de CpGV-R5 mais disparaît dans deux mélanges (à partir de la G3 M99-R01 et de la G4 M90-R10) et tend à disparaître dans les mélanges M50-R50 et M10-R90. CpGV-M se maintient par contre dans les productions successives du mélange M95-R05. Les proportions des deux génomes sont très fluctuantes pour toutes les productions et leur somme n'égale jamais 100% de CpGV détecté et, parfois, le dépasse.

Ces proportions n'atteignant pas un total de 100% constituent le premier indice de possibles événements de recombinaison et, donc, de co-infection d'une cellule par plusieurs GV. Les

marqueurs utilisés pour détecter chaque génome ne sont cependant pas liés à une quelconque efficacité biologique. Nous ne pouvons donc pas conclure sur ce sujet uniquement avec ces résultats.

De nouvelles analyses ont donc été effectuées dans une zone codant pour le contournement de la résistance : *pe38* (Gebhardt *et al.* 2014). Les tests de quantification de chaque génome au niveau du gène *pe38* nous ont permis de montrer que les proportions obtenues sur d'autres parties du génome avec nos marqueurs précédents sont complètement différentes de celles obtenues avec ces nouveaux marqueurs pour les productions issues de larves sensibles. Nous ne trouvons donc pas les mêmes quantités de génome de CpGV-M et CpGV-R5 avec deux marqueurs différents, ce qui indique une recombinaison des génomes.

Cette même analyse effectuée avec les productions issues d'insectes non-permissifs indique clairement une contre sélection du génome de CpGV-M dans 4 des 5 mélanges produits et confirme les événements de recombinaison précédemment observés avec l'apparition de nouvelles bandes sur le gel d'agarose et la différence de proportion de génomes observée avec les deux méthodes.

Le mélange M95-R05 produit sur insectes résistants présente, par contre, les marqueurs *pe38* de CpGV-M et CpGV-R5. Il est, de plus, le seul mélange produit sur carpocapses résistants capable de contrôler efficacement à la fois les insectes sensibles et résistants. Cela semble indiquer que la présence du génome de CpGV-M apporte quelque chose au génome de CpGV-R5. CpGV-M pourrait donc avoir un avantage sur CpGV-R5, expliquant la persistance du génome de CpGV-M dans la nature malgré l'apparition de résistances.

La recombinaison de deux génomes ne pourra se produire qu'en cas de co-infection de la même cellule par deux ou plusieurs GV, les GV n'ayant, par définition, qu'un seul génome. Il apparaît donc ici qu'il y a eu co-infection d'une même cellule épithéliale par plusieurs GV et qu'une multitude de recombinants ont été produits.

4. Conclusion de la partie

Dans ce chapitre, nous avons clairement démontré l'efficacité des mélanges viraux produits sur insectes sensibles et la présence d'événements de co-infection et de recombinaison. Ces résultats peuvent être expliqués par l'absence de pression de sélection qui a permis la production d'une multitude de recombinants. En plus d'apporter de nouvelles perspectives pour les industriels en permettant d'apporter une diversité génétique dans leurs formulations, et ainsi ralentir les phénomènes de résistance, ces résultats constituent une avancée majeure dans la compréhension de l'évolution des GV.

Lors d'une production sur hôte non permissif, le génome de CpGV-M a été rapidement contre sélectionné dans la plupart des mélanges. Seul un mélange a conservé les deux génomes pendant les 6 générations. La meilleure efficacité obtenue pour ce mélange semble indiquer que la présence du génome de CpGV-M apporte un avantage au mélange, comme énoncé dans le [chapitre 7](#). Ce résultat pourrait, en partie, expliquer la présence du génome CpGV-M dans la nature malgré la présence de résistance.

Pour compléter ces résultats, il serait intéressant de produire de nombreuses populations de chacune des générations de mélanges. Il a été montré par Chateigner (2014) que différentes productions du virus d'AcMNPV présentaient des évolutions différentes au cours de passages successifs sur des hôtes permissifs ou réfractaires, avec une réserve de diversité génétique variable. Sur certains hôtes, cette diminution de la diversité génétique s'est accompagnée de l'extinction de la population.

Ces données pourraient permettre d'évaluer la variabilité des recombinaisons des GV et apporter de nouvelles informations sur ces mécanismes très peu connus à ce jour.

Conclusion générale

Cette thèse s'appuie sur deux visions complémentaires, une clairement finalisée, demandant une solution durable aux problèmes de résistance du carpocapse du pommier au CpGV en champs et une plus fondamentale qui consiste en l'étude de l'évolution et de la diversité génétique de plusieurs isolats du granulovirus CpGV.

La question centrale qui a motivé ce travail et permis son déroulement est celle de la durabilité des systèmes de contrôle des ravageurs à l'aide de pathogènes, l'un des outils de la lutte biologique. Cette question de durabilité est une préoccupation centrale pour la recherche agronomique, dans le cadre des objectifs fixés de réduction des intrants tout en maintenant des niveaux de production (en quantité et en qualité) acceptables. La recherche conduite pendant cette thèse s'inscrit dans le projet européen PURE, Innovative Crop Protection for sustainable agriculture (FP7-265865), et plus précisément dans la tâche « Pest evolution and enhancement of the durability of IPM solutions ».

Le choix de l'exploration du système carpocapse du pommier (*Cydia pomonella*)/virus de la granulose (*Cydia pomonella granulovirus*, CpGV) repose à la fois sur l'importance économique de la production de pommes et poires, d'où la nécessité d'avoir les moyens de la protéger contre le carpocapse, mais aussi sur les possibilités d'analyser des interactions hôtes/parasites qu'offre cette famille virale.

Au cours de cette thèse, nous avons exploré plusieurs aspects des interactions granulovirus/hôtes en nous intéressant en premier lieu aux différences de sensibilité des hôtes puis en analysant en profondeur l'effet de la diversité génétique de différentes populations virales sur différents hôtes, et l'évolution de ces populations, avec ou sans pression de sélection, ainsi que leurs capacités adaptatives envers des hôtes non-permissifs.

D'un point de vue appliqué, ce travail a apporté certaines réponses sur la durabilité de la lutte biologique à l'aide du granulovirus mais les résultats obtenus soulèvent encore plus de questions sur l'obtention d'une méthode durable. Il nous est impossible de conseiller une méthode qui garantirait une efficacité constante dans toutes situations sans qu'aucun phénomène de résistance ne se produise mais il paraît clair que les capacités évolutives du virus vont lui permettre de supporter des phénomènes de résistance de la part des hôtes.

Nos résultats suggèrent qu'une solution envisageable est de toujours garder une longueur d'avance sur l'adaptation du ravageur. Un moyen de garantir une lutte durable sera donc de surveiller les populations naturelles de façon continue. Il faudra tout particulièrement surveiller des zones où un échec au traitement par le virus commercialisé serait signalé afin de

pouvoir réagir rapidement en permettant une évolution dirigée du virus pour contourner la résistance de l'hôte. Ces contrôles devront être effectués tous les ans et reposeront sur un travail combiné entre la recherche, les industriels et les exploitants. Seul ce suivi permettra un contrôle efficace de l'hôte en diminuant drastiquement le risque d'échec des traitements.

D'un point de vue fondamental, ces travaux ont permis de mieux connaître les populations de granulovirus et de mettre en lumière une diversité génétique beaucoup plus importante que ce qu'on aurait pu imaginer. La différence de structure entre les nucléopolyédrovirus et les granulovirus ne laissait pas présager cette grande diversité génétique chez CpGV, mais nos résultats mettent en évidence des mécanismes similaires entre ces deux genres comme une possible co-infection de mêmes cellules et la recombinaison de génomes démontrant la possibilité de formation d'une multitude de variants et donc d'une variabilité génétique très élevée.

Pour donner la mesure de la diversité génétique présente chez le CpGV, des analyses par séquençage massif des populations seraient judicieuses. Ces travaux n'ont jamais été envisagés chez les GV mais ont été réalisés récemment sur des populations de NPV. Ce type d'approche permettrait d'évaluer plus précisément l'étendue de la diversité génétique des GV et de mieux comprendre les capacités évolutives de ces virus. Ces métadonnées feraient avancer conjointement la recherche fondamentale et appliquée et permettraient l'élaboration de nouvelles formulations adaptées à différents ravageurs.

Références bibliographiques

- Abot, A. R., Moscardi, F., Fuxa, J. R., Sosagomez, D. R. & Richter, A. R. (1996).** Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological Control* **7**, 126-130.
- Adamo, S. A. & Shoemaker, K. L. (2000).** Effects of parasitism on the octopamine content of the central nervous system of *Manduca sexta*: a possible mechanism underlying host behavioural change. *Canadian journal of zoology* **78**, 1580-1587.
- Agaisse, H. (2007).** An adaptive immune response in *Drosophila*? *Cell Host Microbe* **1**, 91-93.
- Akhila, A. & Rani K. (2002).** Biosynthesis of some biologically active limonoids in the leaves of *Azadirachta indica* (the Indian neem tree). *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry* **11**, 299-302.
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., & Van Baalen, M. (2009).** Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* **22**, 245-259.
- Anderson, R. M. & May, R. M. (1982).** Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411-426.
- Arends, H. M. & Jehle, J. A. (2002).** Homologous recombination between the inverted terminal repeats of defective transposon TCp3. 2 causes an inversion in the genome of *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of General Virology* **83**, 1573-1578.
- Argaud, O., Croizier, L., Lopez-Ferber, M. & Croizier, G. (1998).** Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *Journal of General Virology* **79**, 931-935.
- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K. E., Gund, N. A., Reineke, A., Zebitz, C. P., Heckel, D. G., Huber, J. & Jehle, J. A. (2007).** Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* **317**, 1916-1918.
- Asser-Kaiser, S., Heckel, D. G. & Jehle, J. A. (2010).** Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 59-64.
- Asser-Kaiser, S. & Jehle, J. A. (2009).** Investigations on the mechanism of CpGV resistance in *Cydia Pomonella*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC/wprs Bulletin* **45**, 79-81.
- Asser-Kaiser, S., Radtke, P., El-Salamouny, S., Winstanley, D. & Jehle, J. A. (2011).** Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. *Virology* **410**, 360-367.

- Audemard, H. (1991).** Population dynamics of the codling moth. In: *Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control*. (L. P. S. van der Geest & H. H. Evenhuis, Eds.) Elsevier Science Publishers B V, Amsterdam, pp. 329-338.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. & Possee, R. D. (1994).** The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605.
- Bai, D. L., Lummis, S. C. R., Leicht, W., Breer, H. & Sattelle, D. B., (1991).** Action of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor-neuron. *Pesticide Science* **33**, 197-204.
- Barrera, G., Williams, T., Villamizar, L., Caballero, P. & Simón, O. (2013).** Deletion Genotypes Reduce Occlusion Body Potency but Increase Occlusion Body Production in a Colombian *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus Population. *PLoS one* **8**, e77271.
- Baudry, O., Corroyer, N. & Orts, R. (1996).** La carpovirusine et la lutte contre le carpocapse: Carpocapse des pommes et des poires. *Phytoma-La Défense des végétaux* **482**, 22-24.
- Beas-Catena, A., Sánchez, Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A. & Molina-Grima, E. (2014).** Baculovirus Biopesticides: An Overview. *The Journal Of Animal and Plant Sciences* **24**, 362-373.
- Becnel, J., White, S., Moser, B., Fukuda, T., Rotstein, M., Undeen, A. & Cockburn, A. (2001).** Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*. *Journal of General Virology* **82**, 275-282.
- Berberet, R. C., Zarrabi, A. A., Payton, M. E. & Bisges, A. D. (2003).** Reduction in effective parasitism of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) by *Bathyplectes curculionis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) due to encapsulation. *Environmental Entomology* **32**, 1123–1130.
- Berling, M. (2009).** Durabilité du contrôle du carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*) avec le virus de la granulose (CpGV): Résistance versus Virulence. Pau, France: Pau et des pays de l'Adour, Thèse de Doctorat.
- Berling, M., Blachere-Lopez, C., Soubabere, O., Lery, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B. & Lopez-Ferber, M. (2009).** *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 925-930.
- Berling, M., López-Ferber, M., Bonhomme, A. & Sauphanor, B. (2008).** Resistance of codling moth (*Cydia pomonella*) to granulosis virus (CpGV) in southeast France: First observations on the mode of inheritance. *Insect pathogens and Insect parasitic nematodes. IOBC wprs Bulletin* **31**, 67.

- Berling, M., Sauphanor, B., Bonhomme, A., Siegwart, M. & Lopez-Ferber, M. (2013).** A single sex-linked dominant gene does not fully explain the codling moth's resistance to granulovirus. *Pest Management Science* **69**, 1261-1266.
- Bernal, A., Simón, O., Williams, T., Muñoz, D. & Caballero, P. (2013).** A *Chrysodeixis chalcites* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus population from the Canary Islands is genotypically structured to maximize survival. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 7709-7718.
- Biache, G., Severini, M., Guillon, M. & Quenin, H. (1998).** Traitements avec la Granulose: Effets secondaires sur le Carpocapse. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **504**, 43-44.
- Bilton, J.N., Broughton, H. B., Jones, P. S., Ley, S. V., Lidert, Z., Morgan, E. D., Rzepa, H. S., Sheppard, R. N., Slawin, A. M. Z. & Williams, D. J. (1987).** An x-ray crystallographic, mass spectroscopic, and NMR-study of the limonoid insect antifeedant azadirachtin and related derivatives. *Tetrahedron* **43**, 2805-2815.
- Bishop, D. H. L., Hirst, M. L., Possee, R. D. & Cory, J. S. (1995).** Genetic engineering of microbes: virus insecticides-a case study. *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends* **53**, 249.
- Blissard, G. W. & Wenz, J. R. (1992).** Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology* **66**, 6829-6835.
- Boote, K. J., Jones, J.W., Mishoe, J. W. & Berger, R. D. (1983).** Coupling pests to crop growth simulators to predict yield reductions. *Phytopathology* **73**, 1581-1587.
- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P. Y. Thany, S. H. & Lapied, B. (2012).** Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **341**, 326-339.
- Bonhomme, A., Besse, S., Crabos, L. & Martinez, F. (2011).** Efficacy of CpGV on Oriental Fruit Moth (*Cydia molesta*): myth or reality? *ABIM*, 2001.
- Boucias, D. G., Johnson, D. W. & Allen, G. E. (1980).** Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, larvae. *Environmental Entomology* **9**, 59-61.
- Brain, P. & Glen, D. M. (1989).** A model of the effect of codling moth granulosis virus on *Cydia pomonella*. *Annals of Applied Biology* **115**, 129-140.
- Brandt, S. M., Dionne, M. S., Khush, R. S., Pham, L. N., Vigdal, T. J. & Schneider, D. S. (2004).** Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in A Salmonella-Infected Fruit Fly. *PLoS Biology* **2**, e418.

- Braunagel, S. C., He, H., Ramamurthy, P. & Summers, M. D. (1996).** Transcription, Translation, and Cellular Localization of Three *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Structural Proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology* **222**, 100-114.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. & Soberon, M. (2011).** *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 423-431.
- Briese, D. T. (1982).** Genetic basis for resistance to a granulosis virus in the potato moth *Phthorimaea operculella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **39**, 215-218.
- Briese, D. T. (1986).** Insect resistance to baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses*. (R. R. Granados & B. A. Federici, Eds.) Vol II. CRC Boca Raton, pp. 89-108.
- Briese, D. T., Mende, H. A., Grace, T. D. C. & Geier, P. W. (1980).** Resistance to a nuclear polyhedrosis virus in the light-brown apple moth *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **36**, 211-215.
- Broughton, H. B., Ley, S. V., Lidert, Z., Slawin, A. M. Z., Williams, D. J. & Morgan, E. D. (1986).** X-Ray crystallographic structure determination of detigloyldlhydroazadirachtin and reassignment of the structure of the limonoid insect antifeedant azadirachtin. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 46-47.
- Bull, J. C., Godfray, H. C. & O'Reilly, D. R. (2001).** Persistence of an occlusion-negative recombinant nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* indicates high multiplicity of cellular infection. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5204-5209.
- Burges, H. D. (1971).** Possibilities of Pest Resistance to Microbial Control Agents. In: *Microbial Control of Insects and Mites*. (H. D. Burges & N. W. Hussey, Eds.). Academic press, London, pp. 445-457.
- Burges, H. D. (1982).** Control of insects by bacteria. *Parasitology* **84**, 79-117.
- Bush, M. R., Abdel-All, Y. A. I. & Rock, G. C. (1993).** Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from North Carolina. *Journal of Economic Entomology* **86**, 660-666.
- Caballero, P., Williams, T. & Lopez-Ferber, M. (2001).** Estructura y clasificación de los baculovirus. In: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. (P. Caballero, M. Lopez-Ferber & T. Williams, Eds.) Phytoma, Valencia, España, 15-46.
- Carbonell, L. F., Klowden, M. J. & Miller, L. K. (1985).** Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of Virology* **56**, 153-160.
- Carbonell, L. F. & Miller, L. K. (1987).** Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1412-1417.

- Cardé, R. T. & Minks, A. K. (1995).** Control of moth pests by mating disruption: successes and constraints. *Annual Review of Entomology* **40**, 559–585.
- Caron, V., Myers, J. H. & Gillespie, D. R. (2008).** Fitness-related traits in a parasitoid fly are mediated by effects of plants on its host. *Journal of Applied Entomology* **132**, 663-667.
- Castellanos-Moguel, J., González-Barajas, M., Mier, T., del Rocío Reyes-Montes, M., Aranda, E. & Toriello, C. (2007).** Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista iberoamericana de micología* **24**, 62.
- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1993).** Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**, 245-254.
- Charmillot, P. J., Pasquier, D., Sauphanor, B., Bouvier, J. C. & Olivier, R. (1999).** Carpocapse des pommes: premier cas de résistance au diflubenzuron en Suisse. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture* **31**, 129-132.
- Chateigner, A. (2014).** Influence de l'Environnement sur l'Evolution des génomes de Virus. Université François Rabelais, Tours, France. Thèse de Doctorat.
- Chauthani, A. R., Murphy, D., Claussen, D. & Rehnberg, C. S. (1968).** The effect of human gastric juice on the pathogenicity of *Heliothis zea* nuclear-polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **12**, 145-147.
- Chen, C. J., Quentin, M. E., Brennan, L. A., Kukel, C. & Thiem, S. M. (1998).** Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus hrf-1 expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* **72**, 2526-2531.
- Cheney, S., Hadapad, A. B. & Claus, P. W. Z. (2008).** AFLP analysis of genetic differentiation in CpGV resistant and susceptible *Cydia pomonella* (L.) populations. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemein und angewandte Entomologie* **16**, 116-120.
- Cheng, T., Xu, C. Y., Wang, Y. B., Chen, M., Wu, T., Zhang, J. & Xia, N. S. (2004).** A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World Journal of Gastroenterology* **10**, 1612-1618.
- Ciche, T. A., Darby, C., Ehlers, R. U., Forst, S. & Goodrich-Blair, H. (2006).** Dangerous liaisons: the symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control* **38**, 22-46.
- Clarke, T. E. & Clem, R. J. (2003).** Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. *International reviews of immunology* **22**, 401-424.

- Clavijo, G., Williams, T., Simón, O., Muñoz, D., Cerutti, M., López-Ferber, M. & Caballero P. (2009).** Mixtures of complete and pif1- and pif2-deficient genotypes are required for increased potency of an insect nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* **83**, 5127-5136.
- Clem, R. J., Fechheimer, M. & Miller, L. K. (1991).** Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-1390.
- Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994).** Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 5212-5222.
- Combes, C. (2003).** L'art d'être parasite - Les associations du vivant. Flammarion (Champs). Paris, 362 p.
- Cooper, K. (1991).** Effects of pesticides on wildlife. In: *Handbook of Pesticides Toxicology* (W. J. Hayes, E. R. Laws, Eds.). San Diego/New York: Academic Press Inc., pp. 463-496.
- Corredor, D. & Florez, E. (2003).** Estudios básicos de la biología y comportamiento de la polilla de la papa en un área piloto en el municipio de Villapinzón. Memorias del II Taller nacional sobre *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CPN. Bogota, Colombia, 24-25 abril 2003. 39-45.
- Cory, J. S. & Myers, J. H. (2003).** The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 239-272.
- Cramer, H. H. (1967).** Plant protection and world crop production. *Bayer Pflanzenschutz Nachrichten* **20**, 1-524.
- Creamer, R., Hubble, H. & Lewis A. (2005).** Curtovirus Infection of Chile Pepper in New Mexico. *Plant Diseases* **89**, 480-486.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., D. H. & Dean, D. H. (1998).** Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 807-813.
- Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O. & Poudevigne, D. (1994).** Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **91**, 48-52.
- Crook, N. E., Spencer, R. A., Payne, C. C. & Leisy, D. J. (1985).** Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *Journal of General Virology* **66**, 2423-2430.
- Cummins, J. (2003).** GM viruses as biopesticides. *The Independent Science Panel* <http://www.windsporg/Biopesticidesphp>.
- Cutright, C. R. (1954).** A codling moth population resistant to DDT. *Journal of Economic Entomology* **47**, 189-190.

- Da Silveira, E. B., Cordeiro, B. A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., Soares, E. F. & Bao, S. N. (2007).** An *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus mutant, vApAg, induces hemocytes apoptosis in vivo and displays reduced infectivity in larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Research* **130**, 182-192.
- David, W. A. L. & Gardiner, B. O. C. (1960).** A *Pieris brassicae* (Linnaeus) culture resistant to a granulosis. *Journal of Insect Pathology* **2**, 106-114.
- Davies, A. P., Pufke, U. S. & Zalucki, M. P. (2011).** Spatio-temporal variation in *Helicoverpa* egg parasitism by *Trichogramma* in a tropical Bt-transgenic cotton landscape. *Agricultural and Forest Entomology* **13**, 247-258.
- Dedeine, F., Boulétreau, M. & Vavre, F. (2005).** *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity* **95**, 394-400.
- Dent, D. (1991).** Insect pest management. Ascot, UK: CABI Bioscience.
- Dorn, A., Rademacher, J. M. & Sehn, E. (1987).** Effects of azadirachtin on reproductive organs and fertility in the large milkweed bug. *Proceedings of the 3rd International Neem Conference*.
- Doron-Faigenboim, A., Stern, A., Mayrose, I., Bacharach, E. & Pupko, T. (2005).** Selecton: a server for detecting evolutionary forces at a single amino-acid site. *Bioinformatics* **21**, 2101-2103.
- Dubois, L. (1804).** Du Pommier, du Poirier et du Cormier. Rapport à l'économie rurale, à l'utilité domestique et à l'agrément. Paris.
- Durantel, D., Lòpez-Ferber, M. & Croizier, G. (1998).** Régulation de gènes chez les baculovirus. *Virologie* **2**, 285-295.
- Eberle, K. E., Asser-Kaiser, S., Sayed, S. M., Nguyen, H. T. & Jehle, J. A. (2008).** Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**, 293-298.
- Eberle, K. E. & Jehle, J. A. (2006).** Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**, 201-206.
- Eberle, K. E., Jehle, J. A. & Huber, J. (2012).** Microbial control of crop pests using insect viruses. In: *Integrated Pest Management: Principles and Practice*. (D. P. Abrol, Uma Shankar, Eds.), pp. 281-298.
- Eberle, K. E., Sayed, S. M., Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S. & Jehle, J. A. (2009).** Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *Journal of General Virology* **90**, 662-671.

Eberle, K. E., Wennmann, J. T. Kleespies R. G. & Jehle, J. A. (2012). Basic techniques in insect virology, In: *Manual of techniques in invertebrate pathology*. (Lacey, L.A., Eds.), 2nd edition. Academic Press, pp. 15-74.

Ebert, D. & Hamilton, W. D. (1996). Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 79-82.

Ehlers, R.-U. (2007). Entomopathogenic Nematodes : From Science to Commercial Use. In: *Biological Control: a global perspective*. (C. Vincent, M. S. Goettel & G. Lazarovits , Eds.) CAB International, Wallingford, UK. pp. 136-151.

Engelhard, E. K., Kam-Morgan, L. N., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (1994). The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**, 3224-3227.

Engelhard, E. K. & Volkman L. E. (1995). Developmental resistance in 4th instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* **209**, 384-389.

Engstrom, A., Engstrom, P., Tao, Z. J., Carlsson, A. & Bennich, H. (1984). Insect immunity. The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *Embo Journal* **3**, 2065-2070.

Erlandson, M. A. (2009). Genetic variation in field populations of baculoviruses: mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virologica Sinica* **24**, 458-469.

Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R. D., Chapman, J. W., & Caballero, P. (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology* **92**, 1079-1085.

Espinel, C., Gómez, J., Villamizar, L., Cotes, A. M., Léry, X. & López-Ferber, M. (2009). Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC/wprs Bulletin* **45**, 145-148.

Fang, W. G., Leng, B., Xiao, Y. H., Jin, K., Ma, J. C., Fan, Y. H., Fenq, I., Yang, X. Y., Zhang, Y. J. & Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 363-370.

FAOSTAT (2013). Food and agricultural commodities production

<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> accessed jan 2014.

- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (2005).** Virus taxonomy. VIIIth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G. V. & Wilson, J. A. (1997).** Analysis of p74, a PDV envelope protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo. *Journal of General Virology* **78**, 3091-3100.
- Fields, S. (2001).** Caution--children at play: how dangerous is CCA?. *Environmental Health Perspectives* **109**, 262-269.
- Finney, D. J. (1949).** The adjustment for a natural response rate in probit analysis. *Annals of Applied Biology* **36**, 187-195.
- Finney, J. R. (1971).** Probit Analysis. 3rd edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Feng, R. & Isman, M. B. (1995).** Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Mysus persicae*. *Experientia* **51**, 831-833.
- Franc, N. C. & White, K. (2000).** Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in Drosophila. *Microbes and Infection* **2**, 243-250.
- Frandon, J. & Kabiri, F. (1999).** La lutte biologique contre la pyrale du maïs avec les trichogrammes. *Dossier de l'Environnement* **19**, 107-112.
- Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Zebitz, C. P. W. & Huber, J. (2005).** Codling moth granulovirus: First indication of variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **57**, 29-34.
- Fry, D. M. (1995).** Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives* **103**, 165-171.
- Fuentes-Contreras, E. & Niemeyer H. M. (1998).** DIMBOA glucoside, a wheat chemical defense, affects host acceptance and suitability of *Sitobion avenae* to the cereal aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi*. *Journal of Chemical Ecology* **24**, 371-381.
- Fuxa, J.R. (2004).** Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agriculture Ecosystems & Environment* **103**, 27-43.
- Fuxa, J. R. & Richter, A. R. (1990).** Response of Nuclear Polyhedrosis Virus resistant *Spodoptera frugiperda* larvae to other pathogens and to chemical insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* **55**, 272-277.
- Garavaglia, M. J., Miele, S. A. B., Iserte, J. A., Belaich, M. N. & Ghiringhelli, P. D. (2012).** The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family *Baculoviridae*. *Journal of Virology* **86**, 12069-12079.

- Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zanutto, P. M. A., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M. & Lanoie, J. S. (2004).** Sequence analysis of the genome of *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* **78**, 7036–7051.
- Garnier, L., Gaudin, J. C., Bensadoun, P., Rebillat, I. & Morel, Y. (2009).** Real-Time PCR Assay for Detection of a New Simulant for Poxvirus Biothreat Agents. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 1614-1620.
- Garry, C. E., & Garry, R. F. (2008).** Proteomics computational analyses suggest that baculovirus GP64 superfamily proteins are class III penitrenes. *Virology Journal* **5**, 28.
- Gaugler, R. (2002).** Entomopathogenic Nematology. CAB International, Wallingford, UK.
- Gebhardt, M. M., Eberle, K. E., Radtke, P. & Jehle, J. A. (2014).** Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene *pe38*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **111**, 15711-15716.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. & Stewart, A. (2012).** Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology* **30**, 250-258.
- Glaser, R. W., Farrell, C. C. & Gowen, J. W. (1935).** Field experiments with the Japanese beetle and its nematode parasite. *Journal of the New York Entomological Society* **43**, 345-371.
- Godfray, H. C. J. (1994).** Parasitoids. Princeton University Press, Princeton.
- Goldstein, D. A., Farmer, D. L., Levine, S. L. & Garnett, R. P. (2005).** Mechanism of toxicity of commercial glyphosate formulations: How important is the surfactant? *Clinical Toxicology* **43**, 423-424.
- Gooding, G.V. (1969).** Epidemiology of tobacco mosaic virus on flue-cured tobacco in North Carolina. *Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station* **195**, 24.
- Götz, P. & Boman, H. G. (1985).** Insect immunity. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* **3**, 453-485.
- Götz, P. & Vey, A. (1974).** Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defence reactions of *Chironomus* larvae against fungi. *Parasitology* **68**, 193-205.
- Graham, R. I., Tyne, W. I., Possee, R. D., Sait, S. M. & Hails, R. S. (2004).** Genetically variable nucleopolyhedroviruses isolated from spatially separated populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) in Orkney. *Journal of Invertebrate Pathology* **87**, 29-38.
- Graillet, B., Bayle, S., Blachere-López, C., Besse, S., Siegwart, M. & López-Ferber, M. (2015).** Biological characteristics of experimental CpGV mixed genotype isolates: ability to control susceptible and resistant host populations. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 1000-1008.

- Graillet, B., Berling, M., Blachere-López, C., Siegwart, M., Besse, S. & López-Ferber, M. (2014).** Progressive Adaptation of a CpGV Isolate to Codling Moth Populations Resistant to CpGV-M. *Viruses* **6**, 5135-5144.
- Granados, R. R. & Lawler, K. A. (1981).** In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* **108**, 297-308.
- Grewal, P. S., Ehlers, R.-U. & Shapiro-Ilan, D. I. (2005).** Nematodes as biological control agents. CAB International, Wallingford, UK.
- Groner, A. (1986).** Specificity and safety of baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses*, (R. R. Granados & B. A. Federici, Eds.) CRC Press: Boca Raton, Florida, pp. 177-202.
- Grove, M. J. & Hooper, K. (2007).** Intrastadial developmental resistance of third instar gypsy moths (*Lymantria dispar* L.) to *L. dispar* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* **40**, 355-361.
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J. C. & El Idrissi Ammari, A. M. (1981).** Progrès réalisés dans l'élevage du carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* **1**, 59-64.
- Guo, T., Wang, S., Guo, X. & Lu, C. (2005).** Productive infection of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus in silkworm *Bombyx mori* strain Haoyue due to the absence of a host antiviral factor. *Virology* **341**, 231-237.
- Gutierrez, S. & Lopez-Feber, M. (2004).** Les stratégies des baculovirus pour franchir l'intestin de l'insecte. *Virologie* **8**, 311-321.
- Haas, A. L., Katzung, D. J., Reback, P. M. & Guarino, L. A. (1996).** Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*. *Biochemistry* **35**, 5385-5394.
- Hajek, A. E. (2004).** Natural enemies: an introduction to microbial control. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hajek, A. E. & Stleger, R. J. (1994).** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* **39**, 293-322.
- Harrison, R. L. (2009).** Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. *Journal of invertebrate pathology* **101**, 181-186.
- Harvey, J. P. & Volkman, L. E. (1983).** Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. *Virology* **124**, 21-34.
- Hashimoto, Y., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1991).** Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Journal of General Virology* **72**, 2645-2651.

- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997).** Liquefaction of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus-Infected Insects Is Dependent on the Integrity of Virus-Encoded Chitinase and Cathepsin Genes. *Virology* **238**, 243-253.
- Hefferon, K. L., Oomens, A. G., Monsma, S. A., Finnerty, C. M. & Blissard, G. W. (1999).** Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**, 455-468.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C. & Toprak, U. (2009).** New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* **54**, 285-302.
- Henter, H. J. & Via, S. (1995).** The potential for coevolution in a host–parasitoid system. 1. Genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. *Evolution* **49**, 427–438.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., Cory, J. S. & O'Reilly, D. R. (2003).** The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology* **48**, 211-234.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., O'reilly, D. R. & Cory, J. S. (2004).** Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology* **78**, 3244-3251.
- Hilton, S. (2008).** Baculoviruses: Molecular Biology of Granuloviruses. In: *Encyclopedia of Virology*. (B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel, Eds.) Oxford: Elsevier, pp. 211-219
- Hilton, S. & Winstanley, D. (2007).** Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology* **88**, 1496-504.
- Hitchman, R. B., Hodgson, D. J., King, L. A., Hails, R. S., Cory, J. S. & Possee R. D. (2007).** Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field. *Journal of Invertebrate Pathology* **94**, 153-162.
- Hodgson, D. J., Vanbergen, A. J., Watt, A. D., Hails, R. S. & Cory, J. S. (2001).** Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a lepidopteran baculovirus. *Evolutionary Ecology Research* **3**, 687-701.
- Hough, W. S. (1928).** Relative resistance to arsenical poisoning of two codling moth strains. *Journal of Economic Entomology* **21**, 325-329.
- Howell, J. F. & Neven, L. G. (2000).** Physiological development time and zero development temperature of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology* **29**, 766-772.
- Hoy, M. A. (1998).** Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **353**, 1787-1795.
- Huang, J., Lu, C., Hu, M. & Zhong, G. (2013).** The mitochondria-mediated apoptosis of lepidopteran cells induced by azadirachtin. *Plos one* **8**, e58499.

- Huang, J. F., Shui, K. J., Li, H. Y., Hu, M. Y. & Zhong G. H. (2011).** Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* S1-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**, 16–24.
- Huber, J. (1978).** About the host spectrum of the codling moth granulosis virus. In: *Safety aspects of baculoviruses as biological insecticide* (H. G. Miltenburger, Eds.), Bundesministerium für Forschung & Technologie, Bonn, pp. 75-80.
- Huber, J. (1986).** Use of baculoviruses in pest management programs. In: *The biology of baculoviruses*. (B. R. Granados & B. A. Federici, Eds.) Vol II. CRC Boca Raton, pp. 181-202.
- Huber, J. (2007).** History of CpGV and of the Development of Resistance in Codling Moth. *Second Meeting Sustain CpGV*, Cesenatico, 2007.
- Hufbauer, R. A. & Via, S. (1999).** Evolution of an aphid–parasitoid interaction: variation in resistance to parasitism among aphid populations specialized on different plants. *Evolution* **53**, 1435–1445.
- Hung, S. Y., Boucias, D. G. & Vey, A. J. (1993).** Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* **61**, 179- 187.
- Hunter, D. M. (2010).** Credibility of an IPM Approach for Locust and Grasshopper Control: The Australian Example. *Journal of Orthoptera Research* **19**, 133-137.
- ICTV 2013.** Virus taxonomy: 2013 release, EC 45.
- IJkel, W. F., Westenberg, M., Goldbach, R. W., Blissard, G. W., Vlak, J. M. & Zuidema, D. (2000).** A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. *Virology* **275**, 30-41.
- Janmaat, A. F. & Myers, J. (2003).** Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, 2263-2270.
- Jackson, R. W. (2009).** Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006).** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology* **151**, 1257-1266.
- Jehle, J. A., Fritsch, E., Huber, J. & Backhaus, H. (2003).** Intra-Specific and Inter-Specific Recombination of Tortricid-Specific Granuloviruses during Co-Infection in Insect Larvae, *Archives of Virology* **148**, 1317-1333.

- Jehle, J. A. & Schmitt, A. (2009).** Resistance to baculoviruses – new answers to an old question. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC-WPRS Bulletin* **45**, 125-127.
- Kamita, S. G. & Maeda, S. (1997).** Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* **190**, 173-179.
- Kamita, S. G., Majima, K. & Maeda, S. (1993).** Identification and characterization of the *p35* gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *Journal of Virology* **67**, 455-463.
- Kanga, L. H. B., Pree, D. J., Van Lier, J. L. & Walker, G. M. (2003).** Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. *Pest Management Science* **59**, 921-927.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998).** Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *Journal of General Virology* **79**, 2283-2292.
- Khafagi, W. E. & Hegazi, E. M. (2001).** Effects of juvenile hormones and precocenes on the immune response of *Spodoptera littoralis* larvae to supernumerary larvae of the solitary parasitoid, *Microplitis rufiventris* Kok. *Journal of insect physiology* **47**, 1249-1259.
- Kellerhals, M. (2009).** Introduction to apple (*Malus x domestica*). In *Genetics and genomics of Rosaceae. Plant genetics and genomics: crops and models, Vol 6.* (K. M. Folta & S. E. Gardiner, Eds.). Springer Science, New York, pp 73-84.
- Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G. & Lopez-Ferber, M. (2002).** Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **83**, 3013-3022.
- King, L. A. & Possee, R. D. (1992).** The baculovirus expression system. In: *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide.* (D. R. O'Reilly, L. K. Miller & V. A. Luckow, Eds.) Oxford University Press, NY, 124-126.
- Kirkpatrick, B. A., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (1998).** AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology* **72**, 63-72.
- Knight, A. L., Brunner, J. F. & Alston, D. (1994).** Survey of azinphosmethyl resistance in codling moth. *Journal of Economic Entomology* **87**, 285-292.
- Kohl, J., Gerlagh, M., De Haas, B. H. & Krijger, M. C. (1998).** Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* **88**, 568-75.

- Kondo, A. & Maeda, S. (1991).** Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **65**, 3625-3632.
- Kool, M., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1994).** A putative non-*hr* origin of DNA replication in the *Hind*III-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **75**, 3345-52.
- Koul, O. (1984).** Azadirachtin .2. interaction with the reproductive behavior of red cotton bugs. *Journal of Applied Entomology* **98**, 221-3.
- Koul, O., Shankar, J. S. & Kapil, R. S. (1996).** The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **79**, 43-50.
- Koul, O., Singh, G., Singh, R., Singh, J., Daniewski, W. M. & Berlozecki, S. (2004).** Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *Journal of Biosciences* **29**, 409-416.
- Kraaz, I., Züger, M. & Zingg, D. (2011).** Control of codling moth and oriental fruit moth with MADEX[®] TWIN, a recently selected CpGV isolate. *ABIM 2011*.
- Krumsiek, J., Arnold, R. & Rattei, T. (2007).** Gepard: A rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics* **23**, 1026-1028.
- Lacey, L. A. (2007).** *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* **23**, 133-63.
- Lacey, L. A., Arthurs, S. P. & Headrick, H. (2005).** Comparative activity of the codling moth granulovirus against *Grapholita molesta* and *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of the Entomological Society of British Columbia* **102**, 79-80.
- Lacey, L. A. & Thomson, D. R. (2004).** Codling moth granulovirus: its history and mode of action. In: *Western Orchard Pest and Disease Management Conference*, pp. 18.
- Lacey, L. A., Thomson, D., Vincent, C. & Arthurs, S. P. (2008).** Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Science and Technology* **18**, 639-663.
- Lanier, L. M., Slack, J. M. & Volkman, L. E. (1996).** Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. *Virology* **216**, 380-388.
- Lannan, E., Vandergaast, R. & Friesen, P. D. (2007).** Baculovirus caspase inhibitors P49 and P35 block virus-induced apoptosis downstream of effector caspase DrICE activation in *Drosophila melanogaster* cells. *Journal of Virology* **81**, 9319-9330.

- Lauzon, H. A., Garcia-Maruniak, A., Zanotto, P. M., Clemente, J. C., Herniou, E. A., Lucarotti, C. J., Arif, B. M. & Maruniak, J. E. (2006).** Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. *Journal of General Virology* **87**, 1477-1489.
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2002).** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. & Thiéry, I. (1999).** Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 660-672.
- Lee, C. H., Shih, C. P., Hsu, K. H., Hung, D. Z. & Lin, C. C. (2008).** The early prognostic factors of glyphosate-surfactant intoxication. *American Journal of Emergency Medicine* **26**, 275-281
- Lee, H. H. & Miller, L. K. (1978).** Isolation of genetic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **3**, 754-767.
- Leggett, M., Leland, J., Kellar, K. & Epp, B. (2011).** Formulation of microbial biocontrol agents - an industrial perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* **33**, 101-107.
- Lésel, R. (2004).** Effets du réchauffement climatique. *Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures* **13**, 292.
- Lester, R. J. G., Doubrovsky, A., Paynter, J. L., Sambhi, S. K. & Atherton, J. G. (1987).** Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeus plebejus*. *Diseases of aquatic organisms* **3**, 217-219.
- Levy, S. M., Falleiros, A. M. F., Moscardi, F. & Gregório, E. A. (2007).** Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 183-186.
- Li, L., Li, Q., Willis, L. G., Erlandson, M., Theilmann, D. A., & Donly, C. (2005).** Complete comparative genomic analysis of two field isolates of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A. *Journal of General Virology* **86**, 91-105.
- Li, Q., Li, L., Moore, K., Donly, C., Theilmann, D. A. & Erlandson, M. (2003).** Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. *Journal of General Virology* **84**, 123-132.
- Li, Y. S., Zhao, P., Liu, S. P., Dong, Z., Chen, J., Xiang, Z. & Xia, Q. (2012b).** A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 766-775.

- Li-Ying, L. (1994).** Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops a survey. In: *Biological Control with egg parasitoids*. (E. Wajnberg & S.A. Hassan Eds.) CABI Publishing, Oxon, pp. 37-53.
- Lloyd, C. J. (1969).** Studies on the cross-tolerance to DDT-related compounds of a pyrethrin-resistant strain of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* **5**, 337-356.
- Lockwood, J. A., Sparks, T. C. & Story, R. N. (1984).** Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bulletin of the Entomological Society of America* **30**, 41-51.
- Long, G., Westenberg, M., Wang, H., Vlak, J. M. & Hu, Z. (2006).** Function, oligomerization and N-linked glycosylation of the *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein. *Journal of General Virology* **87**, 839-846.
- Lopez-Ferber, M. & Devauchelle, G. (2005).** Les enjeux écologiques des biopesticides à base de baculovirus. In : *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. (Tec & Doc, Eds.). Lavoisier. France, pp. 589-606.
- López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T. & Caballero, P. (2003).** Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**, 2249-2255.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1997).** Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: *The Baculoviruses*. (L. K. Miller, Eds.) Plenum, New York. pp. 193-216.
- Lung, O., Westenberg, M., Vlak, J. M., Zuidema, D. & Blissard, G. W. (2002).** Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *Journal of Virology* **76**, 5729-5736.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R. & Winstanley, D. (2001).** The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology* **82**, 2531-2547.
- Macintosh, S. C., Stone, T. B., Jokerst, R. S. & Fuchs, R. L. (1991).** Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory selected line of *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8930-8933.
- Maeda, S., Kamita, S. G. & Kondo, A. (1993).** Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology* **67**, 6234-6238.
- Martinet, C. (1996).** Carpopapse des pommes et des poires : Populations en hausse. *Phytoma, la défense des végétaux* **482**, 14-15.

- Mazzone, H. M. & Tignor, G. H. (1976).** Insect viruses: serological relationships. *Advances in Virus Research* **20**, 237-270.
- Mcgaughey, W. H. (1985).** Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**, 193-194.
- Meister, M. (2000).** L'hématopoïèse chez la drosophile. *Médecine sciences* **16**, 1444-1446.
- Meister, M. & Richards, G. (1996).** Ecdysone and insect immunity: the maturation of the inducibility of the dipteracin gene in *Drosophila* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 155-160.
- Mideo, N. (2009).** Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* **25**, 261-268.
- Mishra, G., Chadha, P. & Das, R.H. (2008).** Serine/threonine kinase (pk-1) is a component of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) very late gene transcription complex and it phosphorylates a 102kDa polypeptide of the complex. *Virus Research* **137**, 147-149.
- Miele, S. A. B., Garavaglia, M. J., Belaich, M. N. & Ghiringhelli, P. D. (2011).** Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. *International Journal of Evolutionary Biology* **2011**, 15p. Article ID 379424.
- Miller L. K., Lingg A. J. & Bulla L. A. (1983).** Bacterial, viral, and fungal insecticides. *Science* **219**, 715-721.
- Miller, L. K. & Lu, A. (1997).** The molecular basis of baculovirus host range. In: *The Baculoviruses*. (L. K. Miller, Eds.) Plenum press, New York, pp. 217-235.
- Misfit, H., R., Westward, P. H., Mantel, K. D. & Van De Baan, H. E. (1988).** Resistance to diflubenzuron in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* **81**, 1511-1515.
- Monsma, S. A., Oomens, A. G. & Blissard, G. W. (1996).** The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of Virology* **70**, 4607-4616.
- Morgan, E. D. (2009).** Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 4096-4105.
- Moser, B., Becnel, J., White, S., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S. & Almira, E. (2001).** Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *Journal of General Virology* **82**, 283-297.
- Mota-Sanchez, D., Wise, J. C., Poppen, R. V., Gut, L. J. & Hollingworth, R. M. (2008).** Resistance of codling moth, *Cydia pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity. *Pest Management Science* **64**, 881-890.

- Muirhead-Thomson, R. C. (1960).** The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé* **22**, 721-734.
- Muñoz, D. & Caballero, P. (2001).** Diversidad natural de los baculovirus. In: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. (P. Caballero, M. Lopez-Ferber & T. Williams, Eds.) Phytoma, Valencia, España, pp 95-118.
- Muñoz, D., Castillejo, J. I. & Caballero, P. (1998).** Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied of Environmental Microbiology* **64**, 4372-4377.
- Murillo, R., Lasa, R., Goulson, D., Williams, T., Muñoz, D. & Caballero, P. (2003).** Effect of Tinopal LPW on the Insecticidal Properties and Genetic Stability of the Nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **96**, 1668-1674.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (1995).** Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, Springer Verlag, Wien, New York.
- Narayanan, K. (2004).** Insect defence: its impact on microbial control of insect pests. *Current Science* **86**, 800-814.
- Niño, L. (2004).** Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. *Suplemento Revista latinoamericana de la papa* **199**, 200.
- Nisbet, A. J., Woodford, J. A. T., Strang, R. H. C. & Connolly, J. D. (1993).** Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Mysus persicae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **68**, 87-98.
- Nocera, J. J., Blais, J. M., Beresford, D. V., Finity, L. K., Grooms, C., Kimpe, L. E., Kyser, K., Michelutti, N., Reudink, M. W. & Smol, J. P. (2012).** Historical pesticide applications coincided with an altered diet of aerially foraging insectivorous chimney swifts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**, 3114-3120.
- Nuyttens, D., De Schampheleire, M., Verboven, P., Brusselman, E. & Dekeyser, D. (2009).** Droplet size and velocity characteristics of agricultural sprays. *Transactions of the ASABE* **52**, 1471-1480.
- Oerke, E. C. (2006).** Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* **144**, 31-43.
- Oerke, E. C., Dehne, H.-W., Schonbeck, F. & Weber, A. (1994).** Crop Production and Crop Protection - Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Amsterdam: Elsevier Science.

- Okawa, T., Volkman, L. E. & Welch, M. D. (2010).** Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *Journal of Cell Biology* **190**, 187-195.
- Oomens, A. G. P. & Blissard, G. W. (1999).** Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Virology* **254**, 297-314.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1989).** A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* **245**, 1110-1112.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. (1990).** Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene. *Journal of Virology* **64**, 1321-1328.
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2013).** Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* **4**, 357-374.
- Pasquier, D. & Charmillot, P. (2003).** Effectiveness of Twelve Insecticides Applied Topically to Diapausing Larvae of the Codling Moth. *Cydia pomonella* L. *Pest Management Science* **60**, 305-308.
- Pearson, M. N., Groten, C. & Rohrmann, G. F. (2000).** Identification of the *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Envelope Fusion Protein Provides Evidence for a Phylogenetic Division of the Baculoviridae. *Journal of Virology* **74**, 6126-6131.
- Pearson, M. N., Russell, R. L., Rohrmann, G. F. & Beaudreau, G. S. (1988).** p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology* **167**, 407-413.
- Peng, K. E., van Lent J. W. M., Boeren S., Fang, M., Theilmann D. A., Erlandson, M. A., Vlak, J. M. & Van Oers, M. (2012).** Characterization of Novel Components of the Baculovirus *Per Os* Infectivity Factor Complex. *Journal of Virology* **86**, 4981-4988.
- Peng, K., van Oers, M. M., Hu, Z., van Lent, J. W. & Vlak, J. M. (2010).** Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *Journal of Virology* **84**, 9497-9504.
- Perry, T., Heckel, D. G., Mckenzie, J. A. & Batterham, P. (2008).** Mutations in D alpha 1 or D beta 2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 520-528.
- Pigott, C. R. & Ellar, D. J., (2007).** Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 255-281.
- Pimentel, D. (1968).** Population regulation and genetic feedback evolution provides foundation for control of herbivore, parasite, and predator numbers in nature. *Science* **159**, 1432-1437.

- Poinar, G.O. Jr. (1971).** Use of nematodes for microbial control of insects. In *Microbial control of insects and mites*. (H. D. Burges & N. W. Hussey, Eds.) Academic Press, London, pp 181-204.
- Pollet, A., Barragán, A., Zeddám J. L. & Léry, X. (2003).** *Tecia solanivora* a serious biological invasion of potatoes cultures in S. America. *International Pest Control* **45**, 139-144.
- Pond, S. L. K., Frost, S. D. W. & Muse, S. V. (2005).** HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* **21**, 676-679.
- Possee, R. D. & Rohrmann, G. F. (1997).** Baculovirus Genome Organization and Evolution. In: *The Baculoviruses*. (L. K. Miller, Eds.) Plenum press, New York. pp. 109-140.
- Povolny, D. (1973).** *Scrobipalopsis solanivora* sp.n. A new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central America. *Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica* **21**, 143-146.
- Prakash, G., Padmaja, V., Jami, S. K. & Kirti P. B. (2012).** Expression of chitinase genes of *Metarhizium anisopliae* isolates in lepidopteran pests and on synthetic media. *Journal of Basic Microbiology* **52**, 628-635.
- Pree, D. J., Whitty, K. J., Van Driel, L. & Walker, G. M. (1998).** Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*grapholita molesta*) from the niagara peninsula of Ontario. *The Canadian Entomologist* **130**, 245-256.
- Prikhod'ko, E. A. & Miller, L. K. (1996).** Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. *Journal of Virology* **70**, 7116-7124.
- Prikhod'ko, E. A. & Miller, L. K. (1999).** The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. *Journal of Virology* **73**, 6691-6699.
- Qiao, J., Zou, X., Lai, D., Yan, Y. Wang, Q., Li, W., Deng, S., Xu, H. & Gu, H. (2014).** Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest management Science* **70**, 1041-1047.
- Rapp, J. C., Wilson, J. A. & Miller, L. K. (1998).** Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *Journal of Virology* **72**, 10197-10206.
- Ravensberg, W. J. (2011).** A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods, Springer.
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-Leroux, C. Lereclus, D. & Crickmore, N. (2010).** *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology* **18**, 189-194.
- Read, A. F. & Taylor, L. H. (2001).** The ecology of genetically diverse infections. *Science* **292**, 1099-1102.

- Rebaudo, F., Dangles, O., Zeddami, J. L., Lery, X. & López-Ferber, M. (2006).** Étude de l'efficacité biologique d'un granulovirus pour le contrôle de la teigne guatémaltèque de la pomme de terre *Tecia solanivora*. *AFPP Conférence Internationale sur les maladies des plantes*. Tours, France.
- Reeson, A., Wilson, K., Gunn, A., Hails, R. & Goulson, D. (1998).** Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **265**, 1787-1791.
- Reichelderfer, C. F. & Benton, C. V. (1974).** Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **23**, 378-382.
- Reiser, M., Gröner, A. & Sander, E. (1993).** *Cryptophlebia leucotreta* (Lep.: Tortricidae)-a promising alternate host for mass production of the *Cydia pomonella* granulosis virus (CpGV) for biological pest control. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **100**, 586-598.
- Reuveny, H. & Cohen, E. (2004).** Evaluation of mechanisms of azinphos-methyl resistance in the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **57**, 92-100.
- Reyes, M. & Sauphanor, B. (2008).** Resistance monitoring in codling moth: a need for standardization. *Pest Management Science* **64**, 945-953.
- Rezapanah, M. R., Kharrazi-Pakdel, A., Kamali, K. & Huber, J. (2002).** Survey on natural occurrence of *Cydia Pomonella* granulovirus in apple orchards of Iran. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology* **69**, 49-55.
- Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S., Huber, J. & Jehle, J. A. (2008).** Molecular characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. *Journal of Pest Science* **81**, 187-191.
- Ribeiro, C. & Brehelin, M. (2006).** Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* **52**, 417-429.
- Riedl, H. & Croft, B. A. (1978).** The effects of photoperiod and effective temperatures on the seasonal phenology of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist* **110**, 455-470.
- Rohrmann, G. F. (2013).** Baculovirus Molecular Biology [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US).
- Rohrmann, G. F. & Karplus, P. A. (2001).** Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evol Biol* **1**, 1.
- Ruscoe, C. N. E. (1972).** Growth disruption effects of an insect antifeedant. *Nature New Biology*, **236**. 159-160.

- Sauer, A., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K. & Jehle, J. A. (2014).** A novel mode of resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus. *47th annual meeting of the Society for invertebrate pathology*. Mainz, Germany, 3-8 August 2014.
- Sauphanor, B., Berling, M., Toubon J. F., Reyes, M., Delnatte, J. & Allezmoz, P. (2006).** Carpocapse des pommes cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques : Fruits et légumes. *Phytoma-La Défense des végétaux* **590**, 24-27.
- Sauphanor, B., Bouvier, J. C. & Brosse, V. (1998).** Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera : Tortricidae) in southeastern France. *Journal of Economic Entomology* **91**, 1225-1231.
- Sauphanor, B., Cuany, A., Bouvier, J. C., Brosse, V., Amichot, M., & Bergé, J. B. (1997).** Mechanism of Resistance to Deltamethrin in *Cydia pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide biochemistry and physiology* **58**, 109-117.
- Sauphanor, B., Brosse, V., Bouvier, J., Speich, P., Micoud, A. & Martinet, C. (2000).** Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Management Science* **56**, 74-82.
- Sayed, A. H., Haward, R., Herrero, S., Ferre, J. & Wright D. J. (2000).** Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1509-1516.
- Schmitt, A., Bisutti, I. L., Ladurner, E., Benuzzi, M., Sauphanor, B., Kienzle, J., Zingg, D., Undorf-Spahn, K., Fritsch, E., Huber, J. & Jhele, J. A. (2013).** The occurrence and distribution of resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus in Europe. *Journal of Applied Entomology* **137**, 641-649.
- Schmutterer, H. (1985).** Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? *Journal of Applied Entomology* **100**, 468-475.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001).** Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3702-3706.
- Sheppard, R. F. & Stairs G. R. (1977).** Dosage mortality and time mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology* **29**, 216-221.
- Sieglwart, M., Monteiro, L. B., Maugin, S., Olivares, J., Carvalho, S. M., & Sauphanor, B. (2011).** Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. *Journal of economic entomology* **104**, 636-645.
- Sierra, L. M., Comendador, M. A. & Aguirrezabalaga, I. (1989).** Mechanisms of resistance to acrolein in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Selection Evolution* **21**, 427-436.

- Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., Ley, S. V., Anderson, J. C. & Toogood, P. L. (1990).** Azadirachtin - structural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidopterous larvae. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **55**, 169-81.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2005).** Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4254-4262.
- Simón, O., Palma, L., Williams, T., Lopez-Ferber, M. & Caballero, P. (2012).** Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new *per os* infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 117–126.
- Singer, S. (1981).** Potential of *Bacillus sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. (H. D., Burges, Eds.) New York: Academic Press, pp. 283-298.
- Slack, J. & Arif, B. M. (2007).** The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research* **69**, 99-165.
- Smith, A. G. (1991).** Chlorinated hydrocarbon insecticides. In: *Handbook of Pesticides Toxicology* (W. J. Hayes, E. R. Laws, Eds.). San Diego/New York: Academic Press Inc., pp. 731–915.
- Soderlund, D.M. (2003).** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 563-77.
- Soleño, J., Anguiano, L., de D'Angelo, A. P., Cichón, L., Fernández, D. & Montagna, C. (2008).** Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia. *Pest Management Science* **64**, 964-970.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y. & Govind, S. (2002).** Cellular Immune Response to Parasite Infection in the *Drosophila* Lymph Gland Is Developmentally Regulated. *Developmental biology*, **243**, 65-80.
- Sparks, J. C., Lockwood, J. A., Byford, R. L., Graves, J. B. & Leonard, B. R. (1989).** The role of behavior in insecticide resistance. *Pesticide Science* **26**, 383-399.
- Sparks, T. C., Dripps, J. E., Watson, G. B. & Paroonagian, D. (2012).** Resistance and cross-resistance to the spinosyns - A review and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **102**, 1-10.
- Starnes, R. L., Liu, C. L. & Marrone, P. G. (1993).** History, use, and future of microbial insecticides. *American Entomologist* **39**, 83-91.

- Stern, A., Doron-Faigenboim, A., Erez, E., Martz, E., Bacharach, E. & Pupko, T. (2007).** Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Research* **35**, 506-511.
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J. & Roberts D. W. (1996).** Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6349-6354.
- Strand, M. R. (2008).** The insect cellular immune response. *Insect Science* **15**, 1-14.
- Sun, S. C., Lindstrom, I., Boman, H. G., Faye, I. & Schmidt, O. (1990).** Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* **250**, 1729-1732.
- Suty, L. (2010).** La lutte biologique. Dijon, France: Sick, I.
- Tabashnik, B. E. (1994).** Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* **39**, 47-79.
- Tabashnik, B.E., Brévault, T. & Carrière, Y. (2013).** Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology* **31**, 510-521.
- Tabashnick, B. E. & Croft, B. A. (1982).** Managing pesticide resistance in crop-arthropod complex: interactions between biological and operational factors. *Environmental Entomology* **11**, 1137-1144.
- Tanada, Y. (1964).** Granulosis virus of codling moth *Carpocapsa pomonella* (linnaeus) Olethreutidae Lepidoptera). *Journal of Insect Pathology* **6**, 378.
- Tanada, Y. & Hukuhara. T. (1971).** Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **17**, 116-126
- Tanwar, R., S., Dureja, P. & Rathore, H. S. (2012).** Biopesticides In: *Pesticides, Evaluation of Environmental pollution*. (H. S. Rathore & L. M. L. Nollet, Eds.) CRC press Boca Raton London New York, pp.587-603.
- Taylor, D. A. H. (1987).** Azadirachtin - a study in the methodology of structure determination. *Tetrahedron* **43**, 2779-2787.
- Terra, W. R. (2001).** The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **47**, 47-61.
- Thakore, Y. (2006).** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* **2**, 194-208.
- Thézé, J., Cabodevilla, O., Palma, L., Williams, T., Caballero, P. & Herniou, E. A. (2014).** Genomic diversity in European *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus isolates. *Journal of General Virology* **95**, 2297-2309.

- Thiem, S. M. & Miller, L. K. (1989).** Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **63**, 2008-2018.
- Thompson, S. N. (1999).** Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology* **44**, 561-592.
- Timmins, W. A. & Reynolds, S. E. (1992).** Azadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars - Reduced growth due to impaired protein digestion. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **63**, 47-54.
- Todd, J. W., Passarelli, A. L. & Miller, L. K. (1995).** Eighteen baculovirus genes, including lef-11, p35, 39K, and p47, support late gene expression. *Journal of Virology* **69**, 968-974.
- Trudeau, D., Washburn, J. O. & Volkman, L. E. (2001).** Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *Journal of Virology* **75**, 996-1003.
- Turner, C. J., Tempesta, M. S., Taylor, R. B., Zagorski, M. G., Termini, J. S., Schroeder, D. R. & Nakanishi, K. (1987).** An NMR spectroscopic study of azadirachtin and its trimethyl ether. *Tetrahedron* **43**, 2789-803.
- Undorf-Spahn, K., Fritsch, E., Huber, J., Kienzle, J., Zebitz C. P. W. & Jehle J. A. (2012).** High stability and no fitness costs of the resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M). *Journal of Invertebrate Pathology* **111**, 136-142.
- Van Lenteren, J. C. (1997).** From *Homo economicus* to *Homo ecologicus*: towards environmentally safe pest control. In: *Modern Agriculture and the Environment* (D. Rosen, E. Tel-Or, Y. Hadar & Y. Chen, Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 17-31.
- Van Lenteren, J. C. & Bueno, V. H. P. (2003).** Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl* **48**, 123-139.
- Van Oers, M. M. & Vlak, J. M. (2007).** Baculovirus genomics, *Current Drug Targets* **8**, 1051-1068.
- Van Valen, L. (1973).** A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**, 1-30.
- Vickers, J. M., Cory, J. S. & Entwistle, P. F. (1991).** DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis viruses from the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* **57**, 334-342.
- Villamizar, L., Espinel-Correal, C., Grijalba, E., Cuartas, P., López-Ávila, A. & Cotes, A. M. (2008a).** Development of a granulovirus based insecticide to control the potato tuber moths *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin* **31**, 77-82.

- Virto, C. Zarate, C.A., Lopez-Ferber, M., Murillo, R., Caballero, P. & Williams, T. (2013).** Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus. *Plos one* **8**, e70932.
- Wang, L., Li, X. F., Zhang, J., Zhao, J. Z., Wu, Q. J., Xu, B. & Zhang, Y. J. (2007).** Monitoring of resistance for the diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Ba toxins and a Bt commercial formulation. *Journal of Applied Entomology* **131**, 441-446.
- Wang, P. & Granados, R. R. (2000).** Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 135-143.
- Wang, P. & Granados, R. R. (2001).** Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **47**, 110-118.
- Wang, Y., Kleespies, R. G., Huger, A. M. & Jehle, J. A. (2007).** The genome of *Gryllus bimaculatus* nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects. *Journal of Virology* **81**, 5395-5406.
- Wang, Y. J., Wu, W. B., Li, Z. F., Yuan, M. J., Feng, G. Z., Yu, Q., Yang, K. & Pang, Y. (2007).** *Ac18* is not essential for the propagation of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virology* **367**, 71-81.
- Wajnberg, E. & Hassan, S. A. (1994).** Biological control with egg parasitoids. CABI Publishing, Oxon.
- Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A., Haas-Stapleton, E. J. & Volkman, L. E. (1998).** Evidence That the Stilbene-Derived Optical Brightener M2R Enhances *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by Preventing Sloughing of Infected Midgut Epithelial Cells. *Biological Control* **11**, 58-69.
- Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A. & Volkman, L. E. (1995).** Comparative Pathogenesis of *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus in Larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology* **209**, 561-568.
- Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A. & Volkman, L. E. (1996).** Insect protection against viruses. *Nature* **383**, 767-767.
- Washburn, J. O., Lyons, E. H., Haas-Stapleton, E. J. & Volkman, L. E. (1999).** Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in *Trichoplusia ni*. *Journal of Virology* **73**, 411-416.
- West-Eberhard, M. J. (2003).** Developmental Plasticity and Evolution. Oxford University Press, USA.

- Westenberg, M., Uijtdewilligen, P. & Vlak, J. M. (2007).** Baculovirus envelope fusion proteins F and GP64 exploit distinct receptors to gain entry into cultured insect cells. *Journal of General Virology* **88**, 3302-3306.
- Westenberg, M., & Vlak, J. M. (2008).** GP64 of group I nucleopolyhedroviruses cannot readily rescue infectivity of group II f-null nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* **89**, 424-431.
- Williams, G. M., Kroes, R. & Munro, I. C. (2000).** Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **31**, 117-165
- Winstanley, D. & Crook, N. E. (1993).** Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *Journal of General Virology* **74**, 1599-1609.
- Wright, R. H. (1965).** After Pesticides - What? *Nature* **204**, 121-125.
- Yang, M. M., Li, M. L., an Zhang, Y., Wang, Y. Z., Qu, L. J., Wang, Q. H. & Ding, J. Y. (2012).** Baculoviruses and insect pests control in China. *African Journal of Microbiology Research* **6**, 214-218.
- Yang, Z. H. (2007).** PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1586-1591.
- Zago, H. B., Siqueira, H. Á., Pereira, E. J., Picanço, M. C. & Barros, R. (2014).** Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Management Science* **70**, 488-495.
- Zeddám, J. L., Soberon, R. M. V., Ramos, Z. V. & Lagnaoui, A. (2003).** Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* **29**, 659-667.
- Zhang, C. X., Ma, X. C., & Guo, Z. J. (2005).** Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **333**, 190-199.
- Zhang, S. M. & Loker, E. S. (2004).** Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Gene* **341**, 255-266.
- Zhang, Y. J., Feng, M. G., Fan, Y. H., Luo, Z. B., Yang, X. Y., Wu, D. & Pei, Y. (2008).** A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence. *Biocontrol Science and Technology* **18**, 551-563.

Zhao, J. Z., Li, Y. X., Collins H. L., Gusukuma-Minuto, L., Mau, R. F. L., Thompson, G. D. & Shelton, A. M. (2002). Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae) resistance to spinosad. *Journal of Economic Entomology* **95**, 430-436.

Annexes

Annexe 1

Progressive adaptation of a CpGV isolate to codling moth populations resistant to CpGV-M.

Benoît Graillot, Marie Berling, Christine Blachere-López, Myriam Siegwart, Samantha Besse & Miguel López-Ferber.

Viruses, 2014, Vol 6, pp. 5135-5144.

Article

Progressive Adaptation of a CpGV Isolate to Codling Moth Populations Resistant to CpGV-M

Benoît Graillot ^{1,2}, Marie Berling ^{1,§}, Christine Blachere-López ³, Myriam Siegwart ⁴,
Samantha Besse ² and Miguel López-Ferber ^{1,*}

¹ LGEI, Ecole des Mines d'Alès, Institut Mines-Telecom et Université de Montpellier Sud de France, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France; E-Mails: benoit.graillot@mines-ales.fr (B.G.); mberling@crea.fr (M.B.)

² Natural Plant Protection, Arysta LifeScience group, Avenue Léon Blum, 64000 Pau, France; E-Mail: samantha.besse@arysta.com

³ INRA, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France; E-Mail: christine.blachere-lopez@mines-ales.fr

⁴ INRA, Unité PSH, Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France; E-Mail: myriam.siegwart@avignon.inra.fr

§ Present address: Créa, 215 Avenue de la Roche Parnale, ZI Motte Longue, 74130 Bonneville, France.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: miguel.lopez-ferber@mines-ales.fr; Tel.: +33-466-782-704 (ext. 123); Fax: +33-466-782-701.

External Editor: John Burand

Received: 17 September 2014; in revised form: 4 December 2014 / Accepted: 15 December 2014 /

Published: 22 December 2014

Abstract: The NPP-R1 isolate of CpGV is able to replicate on CpGV-M-resistant codling moths. However, its efficacy is not sufficient to provide acceptable levels of control in natural (orchard) conditions. A laboratory colony derived from resistant codling moths was established, which exhibited a homogeneous genetic background and a resistance level more than 7000 fold. By successive cycles of replication of NPP-R1 in this colony, we observed a progressive increase in efficacy. After 16 cycles (isolate 2016-r16), the efficacy of the virus isolate was equivalent to that of CpGV-M on susceptible insects. This isolate was able to control both CpGV-M-susceptible and CpGV-M-resistant insects with similar efficacy. No reduction in the levels of occlusion body production in susceptible larvae was observed for 2016-r16 compared to CpGV-M.

Keywords: *Cydia pomonella granulovirus*; codling moth; resistance development; biological control

1. Introduction

Codling moth (CM) is a major insect pest of apples and pears [1]. CM is distributed worldwide in temperate climates in the majority of apple production areas [2]. After years of chemical control, CM progressively developed resistances to most chemical insecticides [3], making the use of alternative methods for pest control necessary to sustain production and reduce environmental impacts.

Among biological control agents, baculoviruses (Nucleopolyhedroviruses (NPVs) and Granuloviruses (GVs)) are the only virus group used in field conditions. They are used as microbial insecticides due to their specificity for one or a few insect species [4], in annual cultures, in orchards, or in forests [5,6]. Baculoviruses are double stranded-DNA viruses restricted to invertebrates, and more precisely arthropods [6]. Baculoviruses have genome sizes ranging from 80–180 kbp, and replicate in the nucleus of infected cells. These viruses are characterised by enveloped rod-shaped nucleocapsids occluded in a proteinaceous matrix [7]. Baculovirus possess two types of particles, the Occlusion Body (OB), containing one or more virions, that ensures horizontal transmission between susceptible hosts; and the Budded Virus, a much simpler particle containing one virus genome used for transmission between cells inside the host. There are two different types of OBs: the first is small, granular, ellipsoidal-shaped occlusion bodies, characteristic of the GV (now called betabaculoviruses), that generally contains a single enveloped nucleocapsid and the second, bigger, polyhedron shaped, present in all other Baculovirus genera, lepidopteran nucleopolyhedrovirus (NPV) or alphabaculoviruses, hymenopteran NPV or gammabaculoviruses, and dipteran NPV or deltabaculoviruses. Each polyhedron contains numerous nucleocapsids enveloped alone (single enveloped) or in groups (multiple enveloped), and distributed throughout the polyhedral occlusion body matrix. Baculoviruses infect the larval stages of insects particularly in the order Lepidoptera [8].

The first *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) isolate was found in Mexico (CpGV-M, [9]). In Europe, all commercial formulations before 2010 were derived from this CpGV-M isolate [10]. This isolate appears to have limited genetic diversity [11] and a representative clone has been completely sequenced [12], making it the reference genotype.

Since 2004, after years of generalized use, resistance to CpGV-M has been reported in orchards in Germany [13] and France [14]. Now, resistance is distributed across Europe [15], but not in other continents. This may be due to a lower use of CpGV isolates.

In order to bypass this resistance, research was conducted to obtain new viral variants able to control these resistant insect populations. Various natural isolates were found to be able to partially overcome the resistance; among them, the isolate NPP-R1 [16].

Natural virus populations present an inherent genetic diversity and are able to evolve when conditions allow adaptation of the pathogen to the host. Taking advantage of this fact, a selection process has been carried out by successive passages on a resistant insect laboratory colony, called RGV, in order to increase the efficiency of the NPP-R1 isolate [16]. The efficiency and specificity of

the NPP-R1 virus and the 2016-r4 isolate corresponding to the fourth passage have been previously described. An increasing activity against resistant insects was detected at that point [16].

We have continued the process for 16 generations of codling moth. In this study, we characterize the virus populations by their efficacy on controlling CpGV-M susceptible and resistant codling moth laboratory colonies; their genetic composition, and their productivity.

2. Materials and Methods

2.1. Insects

Two *Cydia pomonella* laboratory colonies were used in this work, a laboratory colony susceptible to CpGV-M, used as reference colony; and the resistant colony, RGV. This last colony was derived from a natural resistant population (St-A) found in the region of Saint Andiol (Bouches-du-Rhône, France), followed by selection for resistance to CpGV-M as previously described [16]. RGV is periodically selected for CpGV-M resistance in order to maintain a high level of resistance [16].

2.2. Viruses

The CpGV-M isolate (our laboratory stock 2020-s1) is used as a reference and comes from the inoculum for production of Carpovirusine (Natural Plant Protection (NPP), Arysta LifeScience group, Pau, France) and is genetically and phenotypically similar to the Mexican isolate discovered and described by Tanada (1964) [9].

The NPP-R1 isolate was provided by NPP. This isolate comes from the virus collection of the firm. The original stock was amplified using the susceptible colony reared at the NPP facility prior to use in bioassays. The 2016-r4; 2016-r8 and 2016-r16 isolates are respectively the result of four, eight and 16 cycles of multiplication of NPP-R1 on RGV larvae.

2.3. Amplification of Virus

Third-instar (L3) resistant larvae (7 days old) reared on a virus-free diet were used for viral amplification. A viral suspension was prepared in distilled water at a concentration of 800 OB/ μ L. Fifty μ L was deposited evenly on the surface of a formaldehyde free-diet (Stonefly Heliothis Diet, Ward's Science, Rochester, NY, USA) in 24-well plates and allowed to penetrate. Then L3 larvae were deposited on these plates and incubated at 25 °C (\pm 1 °C) with a 16:8-h (light/dark) photoperiod and a relative humidity of 60% (\pm 10%). After 4 days, all larvae presenting signs of viral infection were extracted from the rearing diet and transferred to Eppendorf[®] tubes and stored at the same temperature for an additional day, then frozen (−20 °C). Larvae were processed as previously described [16]. The occlusion bodies were resuspended in distilled water, and stored at −20 °C.

The same process was carried out for each virus passage.

2.4. Evaluation of Viral Production of 2016-r8 and 2016-r16 Isolate

The protocol described above (Section 2.3) was used using susceptible larvae, to allow replication without a selective pressure. Larvae were pooled by groups of three and weighed before homogenisation. 30 groups are analyzed for each isolate. The production yields expressed in OBs/larva and OBs/g of larva were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test.

2.5. Bioassays

Bioassays were carried out as previously described [16]. Briefly, neonate larvae of both laboratory colonies, susceptible and resistant (24 h old or less) were individually placed in 96-well plates containing about 200 μ L of a formaldehyde-free artificial diet (Stonefly Heliiothis Diet, Ward's Science, Rochester, NY, USA), after a 6- μ L volume of an OB suspension was spread over the surface of each well (well surface area = 28 mm²). The same volume of distilled water was used in control wells. Bioassays were performed using six virus concentrations, ranging from 2–6250 OBs/ μ L for the most efficient virus/host combination and 10–100,000 OBs/ μ L for the least efficient combination. The wells were sealed with Parafilm™, and the microplates were incubated in a growth chamber at 25 °C (\pm 1 °C) with a 16:8-h (light/dark) photoperiod and a relative humidity of 60% (\pm 10%). Mortality was recorded at 7 days postinfection. Larvae that did not react to physical stimuli were considered dead. At least three independent experiments were carried out. After verifying their homogeneity, the data were pooled. Mortality data were subjected to probit analysis [17] performed with the POLO+ software (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) [18].

2.6. DNA Extraction and Restriction Endonuclease (REN) Analysis of CpGV Isolates

Viral DNA of the different productions detailed in Section 2.3, was extracted from OBs as previously described [16]. Approximately 500 ng of purified virus DNA was digested with *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Sal*I, or *Xho*I (Fisher Scientific, Illkirch, France) in the supplied buffer at 37 °C for 3 h. The DNA restriction fragments were separated by electrophoresis in 1% agarose gels in Tris-acetate-EDTA buffer at 80 V for approximately 4 h. λ -phage DNA/ *Hind*III fragments were used as standards for size determination. Fragments were visualized under UV light by ethidium bromide staining. The fragment sizes and DNA quantity were estimated using the Kodak 1D image system (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

3. Results

3.1. REN Analysis

DNA from NPP-RI and all the successive passages were compared to that from CpGV-M using *Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I, *Sal*I and *Xho*I. Submolar fragments were observed in all isolates, but their relative proportions changed over passages. The characteristic pattern of CpGV-M, in conformity with the published sequence, was observed for all enzymes in the NPP-R1 isolate, mixed with a new pattern, characterized for a supplementary *Eco*RI site around position 58000, the disappearance of the *Bam*HI site at 17745; the appearance of two *Pst*I sites at 38800 and 86500; for *Sal*I, two supplementary

sites were observed around positions 13100 and 49000. No differences were detected on *XhoI* profiles. From passages 4–16, this new profile becomes more frequent. At passage 16, the CpGV-M pattern is undetectable. These changes are represented in Figure 1.

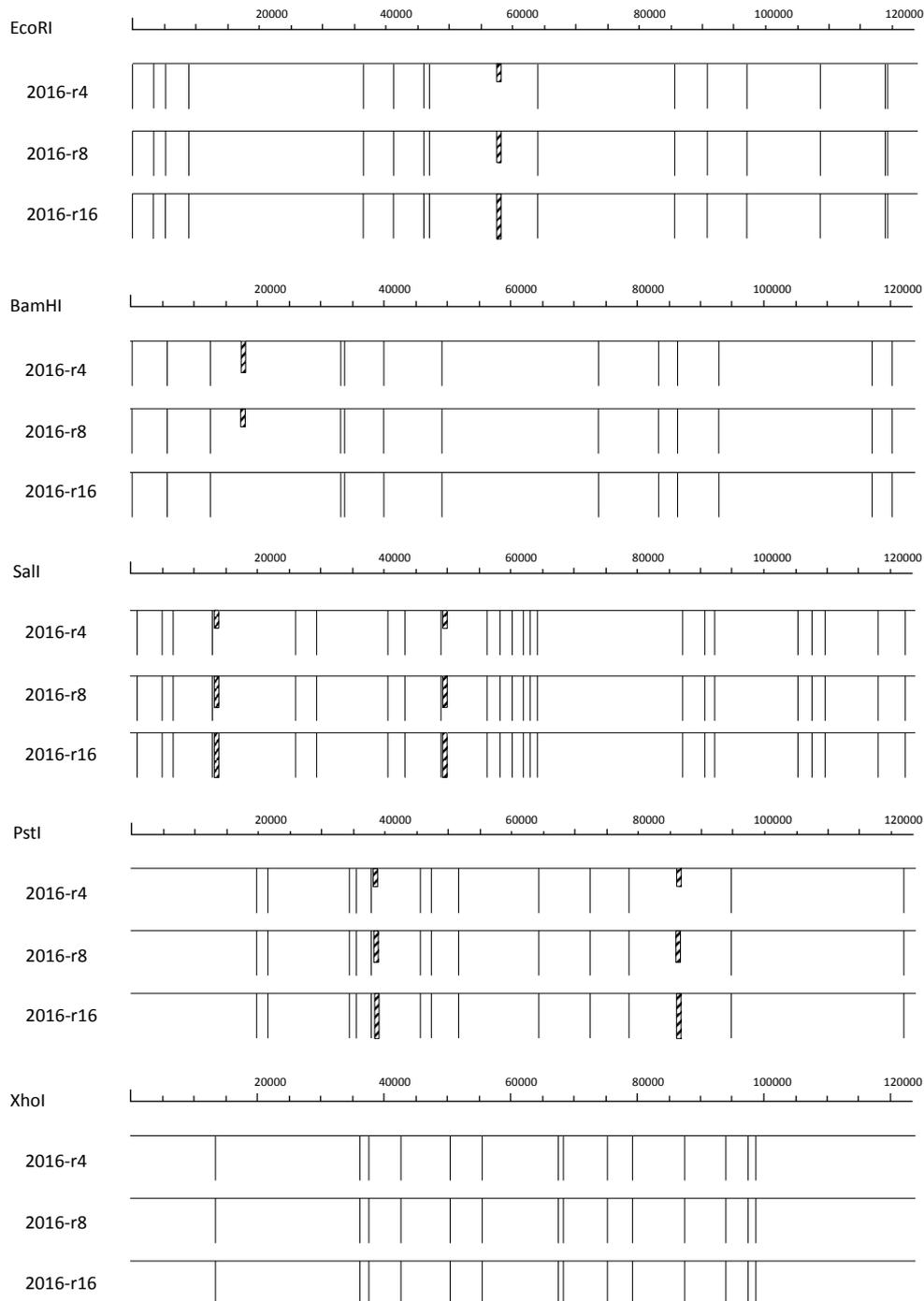


Figure 1. Graphical map of the genomes of CpGV isolates obtained after sequential amplification on resistant RGV larvae. The relative proportion of the variable restriction sites are represented by dashed rectangles. Their length is proportional to the relative abundance. The restriction sites shared by the three isolates are represented by lines of equal length.

Table 1. Production per larvae and per gram of larvae of three virus isolates on susceptible insects.

Virus isolate	Production (per gram of larvae ($\times 10^{11}$ OB/g) \pm SE)	Production per larvae * ($\times 10^{10}$ OB/g) \pm SE
CpGV-M	4.84 \pm 0.29 ^a	2.48 \pm 0.10 ^b
2016-r8	5.77 \pm 0.29 ^a	2.99 \pm 0.19 ^b
2016-r16	5.41 \pm 0.16 ^a	2.54 \pm 0.11 ^b

* Mean production of a larvae estimated by 10 pools of 3 larvae each. Similar letters indicate no statistically significant differences by Kruskal Wallis test; superscript: results having the same letter. *i.e.*, ^a or ^b indicate they are not statistically different.

Table 2. Pathogenicities, measured by LC₅₀ and LC₉₀, of four virus isolates on *Cydia pomonella* laboratory colonies susceptible and resistant to CpGV-M.

Host colony	Virus isolate	Total No. of insects tested	No. of Occlusion Bodies/ μ L (95% CI)		Slope \pm SE	χ^2	Resistance factor (fold) ^(a)	
			LC ₅₀	LC ₉₀			LC50	LC90
Susceptible	CpGV-M	786	13.10 (6.55–23.20)	223.10 (110.70–654.18)	1.04 \pm 0.09	5.99	1.0	1.0
	NPP-R1 ^(b)	689	25.80 (14.48–39.93)	328.55 (196.93–702.51)	1.16 \pm 0.13	1.28	2.0	1.5
	2016-r4 ^(b)	999	39.65 (6.40–133.91)	805.85 (260.20–1.36 $\times 10^3$)	0.98 \pm 0.11	13.60	3.0	3.6
	2016-r8	445	48.37 (21.18–81.44)	280.52 (158.02–857.03)	1.68 \pm 0.25	4.67	3.7	1.3
	2016-r16	790	6.76 (2.60–13.37)	59.63 (27.54–278.55)	1.36 \pm 0.13	11.42	0.5	0.3
Resistant	CpGV-M	396	7.84 $\times 10^3$ (660.45–4.13 $\times 10^4$)	1.71 $\times 10^6$ (2.15 $\times 10^5$ –6.72 $\times 10^8$)	0.55 \pm 0.09	6.32	598	7664.7
	NPP-R1 ^(b)	578	166.31 (91.21–278.27)	1.28 $\times 10^4$ (5.95 $\times 10^3$ –3.80 $\times 10^4$)	0.70 \pm 0.08	4.81	12.7	57.4
	2016-r4 ^(b)	1201	102.31 (63.20–146.91)	1.57 $\times 10^3$ (1.01 $\times 10^3$ –2.97 $\times 10^3$)	1.10 \pm 0.10	6.21	7.8	7.0
	2016-r8	456	41.27 (26.97–58.96)	319.24 (207.87–582.06)	1.44 \pm 0.17	1.83	3.2	1.4
	2016-r16	545	22.43 (13.73–34.36)	410.67 (240.16–846.43)	1.02 \pm 0.11	3.60	1.7	1.8

^(a) The pathogenicity of CpGV-M on susceptible larvae is used as a reference level; ^(b) Results from [16].

3.2. Viral Production of Isolates

No difference was found in the production per grams of susceptible larvae between CpGV-M, 2016-r8 and 2016-r16 (Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 29$, $df = 28$, $p = 0.4125$) (Table 1).

3.3. Bioassays

Bioassays were performed with the NPP-R1, 2016-r4 (data from [16]), 2016-r8 and 2016-r16 isolates on susceptible and resistant larvae. The efficiency of each viral isolates was estimated by probit analysis (Table 2).

On susceptible larvae, the NPP-R1, the 2016-r4 and the 2016-r8 isolates were less efficient than CpGV-M isolate. Surprisingly, the 2016-r16 isolate was more efficient (LC₅₀: 6.76 OB/μL (2.60–13.37); LC₉₀: 59.63 OB/μL (27.54–278.55)) than CpGV-M isolate (LC₅₀: 13.10 OB/μL (6.55–23.20); LC₉₀: 223.10 OB/μL (110.70–654.18)). On resistant larvae, an increase of efficiency was observed up to the 2016-r8 isolate. The 2016-r16 isolate had a slightly better LC₅₀ (22.43 OB/μL (13.73–34.36)) and similar LC₉₀ (410.67 OB/μL (240.16–846.43)) than 2016-r8 (LC₅₀: 41.27 OB/μL (26.97–58.96); LC₉₀: 319.24 OB/μL (207.87–582.06)) indicating that this isolate was completely stabilized.

4. Discussion

Codling moth resistant natural populations did not respond to control by CpGV-M. The resistance levels were variable, from a hundred fold to more than a thousand fold resistance as a function of the relative frequency of the resistant genotypes. The RGV resistant colony, developed from a natural population, exhibits a homogeneous resistance level against CpGV-M of 7665 fold (LC₉₀), compared to the level for the susceptible colony. This homogeneity allowed a precise estimate of the resistance, a selection of a virus isolate, and the evaluation of the gains in efficacy over successive passages. The isolate NPP-R1 is partially able to control the resistant colony, but the efficacy ratio (LC₉₀ on resistant insect/LC₉₀ on susceptible insects = 57) was not satisfactory for its use in field conditions, as it would require application doses too high to be compatible with economic constraints.

Following passages of the NPP-R1 isolate on resistant larvae, the efficiency of the viruses increased up to the 2016-r8 isolate (eighth passage). The efficiency of the 16th passage 2016-r16 was comparable to 2016-r8, indicating a stabilization of the isolate.

A first attempt to characterize the NPP-R1 virus isolate and its evolution over selection was made using a RFLP approach. This approach allowed us to demonstrate that the original isolate is composed of at least two genotypes, one similar to CpGV-M, and that the relative proportion of this genotype diminished over passages on a resistant insect colony, but they do not disappear. The selected genotype is characterized by modifications of various restriction sites on its genome. It has been recently demonstrated that modification at the level of the *pe38* virus gene is responsible of overcoming the resistance [19]. This gene is located between 18574 and 19722 nt on CpGV-M [12]. The differences observed do not affect this region. Accordingly, they probably do not present a selective value.

The final isolate obtained, 2016-r16, was able to efficiently control the resistant colony. Surprisingly, this isolate also controlled the susceptible colony as well or better than the reference

isolate, CpGV-M, indicating its potential usefulness as a control agent for insect field populations of codling moth presenting variable ratios of susceptible *vs.* resistant insects.

The OB production under our conditions appeared to be higher than the usual levels (2.5×10^9 OB/larva [20]). The differences were probably related to the protocol of larvae rearing. Using different conditions, Reiser *et al.* (1993) reported a yield of 1.7×10^{10} OB/larva [21].

The virus yield was compared on susceptible larvae for 2016-r8 and 2016-r16 and the reference CpGV-M. No differences in virus production were observed either when considering OB per larva nor OB per gram of larvae. The experimental conditions used in our test did not allow verifying if there were differences in the speed of kill.

A recent work revealed that there is no apparent fitness cost for the insect to become resistant [22]. Our data did not find either a cost for the virus to overcome this resistance. Putting together our data, similar efficacy and similar level of production in both insect colonies, it is tempting to hypothesize that there is neither a genetic cost for the virus to overcome the resistance. If there is no genetic cost for a virus population on controlling resistant populations, what is the rationale of the preservation in nature of CpGV-M? Clearly, using only two fitness parameters, it is not possible to accept or refuse this hypothesis, and more research will be required before being able to do so.

The isolate 2016r16 is able to efficiently overcome the resistance to CpGV-M. This isolate is now commercialized by Natural Plant Protection under the “Carpovirusine Evo2” designation.

Acknowledgments

“The research leading to these results has received funding from the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the grant agreement number FP7-265865”, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR06-RIB-003-02). Benoît Graillot is recipient of a French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie doctoral grant. Marie Berling is recipient of a doctoral grant from the Ecole des mines d’Alès. The authors want to thank the constructive contributions of the reviewers.

Author Contributions

Benoît Graillot, Marie Berling and Christine Blachere-López conducted the experimental assays. Samantha Besse provided the original NPP-R1 isolate and made all the virus titrations. Samantha Besse, Myriam Siegwart and Miguel López-Ferber supervised the work and analysed the results. All authors contributed to writing.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Cross, J.V.; Solomon, M.G.; Chandler, D.; Jarret, P.; Richardson, P.N.; Winstanley, D.; Bathon, H.; Huber, J.; Keller, B.; Langenbruch, G.A.; *et al.* Biocontrol of Pests of Apples and Pears in Northern and Central Europe: 1. Microbial Agents and Nematodes. *Biocontrol. Sci. Technol.* **1999**, *9*, 125–149.
2. Willett, M.J.; Neven, L.; Miller, C.E. The occurrence of codling moth in low latitude countries: Validation of pest distribution reports. *HortTechnology* **2009**, *19*, 633–637.
3. Reyes, M.; Franck, P.; Charmillot, P.J.; Ioriatti, C.; Olivares, J.; Pasqualini, E.; Sauphanor, B. Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manage. Sci.* **2007**, *63*, 890–902.
4. Gröner, A. Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses: Biological Properties and Molecular Biology*; Granados, R.R., Federici, B.A., Eds.; Academic Press: San Diego, CA., USA, 1986; Volume 1, pp. 177–202.
5. Moscardi, F.; Souza, M.L.; Castro, M.E.B.; Moscardi, M.; Szewczyk, B. Baculovirus Pesticides: Present State and Future Perspectives. In *Microbes and Microbial Technology*, 1st ed.; Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 415–445.
6. Rohrmann, G.F. *Baculovirus Molecular Biology*. National Library of Medicine: Bethesda, MD, USA, 2013.
7. Thiem, S.M.; Cheng, X.W. Baculovirus host-range. *Virologica Sinica* **2009**, *24*, 436–457.
8. Jehle, J.A.; Blissard, G.W.; Bonning, B.C.; Cory, J.S.; Herniou, E.A.; Rohrmann, G.F.; Theilmann, D.A.; Thiem, S.M.; Vlak, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 1257–1266.
9. Tanada, Y. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. Insect Pathol.* **1964**, *6*, 378–380.
10. Lacey, L.A.; Thompson, D.; Vincent, C.; Arthurs, S.P. Codling moth granulovirus: A comprehensive review. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2008**, *18*, 639–663.
11. Crook, N.E.; Spencer, R.A.; Payne, C.C.; Leisy, D.J. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J. Gen. Virol.* **1985**, *66*, 2423–2430.
12. Luque, T.; Finch, R.; Crook, N.; O'Reilly, D.R.; Winstanley, D. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 2531–2547.
13. Fritsch, E.; Undorf-Span, K.; Kienle, J.; Zebitz, C.P.W.; Huber, J. Codling moth granulovirus: Variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **2005**, *57*, 29–34.
14. Sauphanor, B.; Berling, M.; Toubon, J.F.; Reyes, M.; Delnatte, J.; Allemoz, P. Carpopapse des pommes: Cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques. *Phytoma Def. Veg.* **2006**, *590*, 24–27.
15. Schmitt, A.; Bisutti, I.L.; Ladurner, E.; Benuzzi, M.; Sauphanor, B.; Kienzle, J.; Zingg, D.; Undorf-Spahn, K.; Fritsch, E.; Huber, J.; *et al.* The occurrence and distribution of resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus in Europe. *J. Appl. Entomol.* **2013**, *137*, 641–649.

16. Berling, M.; Blachere-Lopez, C.; Soubabere, O.; Lery, X.; Bonhomme, A.; Sauphanor, B.; Lopez-Ferber, M. *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Appl. Environ. Microb.* **2009**, *75*, 925–930.
17. Finney, J.R. *Probit Analysis*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1971.
18. *POLO-PC software*, Version 2.0; a user's manual for Probit or Logit analysis; LeOra Software: Berkeley, CA, USA, 1987.
19. Gebhardt, M.M.; Eberle, K.E.; Radtke, P.; Jehle, J.A. Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene pe38. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 15711–15716.
20. Eberle, K.E.; Wennmann, J.T.; Kleespies, R.G.; Jehle, J.A. Basic techniques in insect virology. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2nd ed.; Lacey, L.A., Ed.; Academic Press: Waltham, Ma, USA, 2012.
21. Reiser, M.; Groner, A.; Sander, E. *Cryptophlebia-leucotreta* (Lep, Tortricidae) a promising alternate host for mass-production of CpGV for biological pest-control. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* **1993**, *100*, 586–598.
22. Undorf-Spahn, K.; Fritsch, E.; Huber, J.; Kienzle, J.; Zebitz, C.P.W.; Jehle, J.A. High stability and no fitness costs of the resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M). *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *111*, 136–142.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 2

Variations in the susceptibility to CpGV in populations of the codling moth, *Cydia pomonella*

Benoît Graillot, Christine Blachere-López, Samantha Besse, Myriam Siegwart,
& Miguel López-Ferber.

IOBC/WRPS Bulletin, 2013, Vol 90, pp. 149-153.

Variations in the susceptibility to CpGV in populations of the codling moth, *Cydia pomonella*

Benoit Graillot^{1,2}, Christine Blachere^{1,3}, Samantha Besse², Myriam Siegwart⁴, Miguel Lopez-Ferber¹

¹LGEI, Ecole des Mines d'Alès, Institut Mines-Telecom et Université de Montpellier Sud de France, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France;

²Natural Plant Protection, Arysta LifeScience group, Avenue Léon Blum, 64 000 Pau, France ;

³INRA, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France;

⁴INRA, unité PSH, Agroparc, 84914 AVIGNON Cedex 9, France

Abstract: Failure in codling moth populations control with CpGV in apple orchards has been attributed to the action of a single allele located in the Z chromosome. However, differences in the mortality patterns between genetically homogeneous susceptible and resistant insect laboratory strongly suggest that other mechanisms are responsible of variation in the susceptibility of insect to CpGV isolates.

Key words: *Cydia pomonella*, multigenic resistance

Introduction

The *Cydia pomonella granulovirus*, CpGV (Betabaculoviridae) has been extensively used for the control of codling moth proliferation in orchards soon after its first isolation (Tanada, 1964) and characterisation (Crook *et al.*, 1985). In 2005, a failure of control and possible development of resistance was reported in Germany (Fritsch *et al.*, 2005), later in France (Sauphanor *et al.*, 2006) and other parts of Europe (Jehle & Schmitt, 2009). First investigations into the resistance of *C. pomonella* to CpGV-M carried out in Germany using single pair crosses clearly indicated monogenic and sex-linked resistance (Asser-Kaiser *et al.*, 2007). Recently more detailed studies suggested that other mechanisms are required to explain the observed response of natural and laboratory populations to virus challenges (Berling *et al.*, 2013; Jehle & Schmitt, 2009). In this study, the response of laboratory colonies to virus challenge has been analysed from this perspective.

Material and methods

Insect colonies

Three *Cydia pomonella* colonies were used in this analysis: i) the S_V colony, a susceptible laboratory imbred strain, derived from a field population collected at Les Vignières (Vaucluse, France) in early nineties, and reared without selection pressure at INRA (Avignon); ii) the R_{GV} colony (Berling *et al.*, 2009), derived from S_V by introgression of the major resistant determinant found in a french natural resistant population in St Andriol (Sauphanor *et al.*, 2006), and the CpNPP colony, that is the susceptible colony used at industrial level for the production of Carpovirusine™. CpNPP has been reared in laboratory

for more than 20 years and originally comes from northern France. All colonies are reared on artificial diet (Guenelon *et al.*, 1981).

Virus isolates

Two *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) (Betabaculovirinae, Baculoviridae) isolates were used in this study, the CpGV–M isolate, found in Mexico (Tanada, 1964), and the CpGV-R5, derived from NPP-R1 by selection on RGV insects (Besse *et al.*, 2011) for 16 passages as previously described (Berling *et al.*, 2009).

Bioassays

Bioassays against neonate larvae (0 to 12 h old) were carried out using a diet surface contamination method in 96-well plates containing about 200µl of a formaldehyde-free artificial diet (Heliiothis Diet; Ward's Natural Science, USA). A 6µl volume of an OB suspension was deposited over the diet surface of each well (well surface area 28 mm²). The same volume of distilled water was used in control wells. Bioassays were performed using five or six CpGV concentrations, ranging from 3 to 729 OBs/µl for the most efficient isolates (corresponding to 0.643 to 156.2 OBs/mm² of diet surface) and up to 3.125 x10⁶ OBs/µl for the RGV colony for the least efficient isolate (6.696 x10⁵ OBs/mm²). One larva was placed in each well. The wells were sealed with parafilm, and the microplates were incubated in a growth chamber at 25°C with a 16:8-h (light/dark) photoperiod. Larvae dying during the first day postinoculation were excluded from the analysis. Three to five different independent replicate tests have been performed for each modality representing 600 to 1000 infected individuals per modality. Tests presenting high mortality in controls (more than 10%) or have been removed from the analysis. Mortality was recorded at 7 days postinfection. Larvae that did not react to physical stimuli were considered dead. Data were subjected to analysis using the software Polo+ (LeOra Software 2012).

Results and discussion

It has been proven that the major determinant of resistance to CpGV-M is located on the Z chromosome, and thus, follows a sexual transmission pattern (Asser-Kaiser *et al.*, 2007). However, careful analysis of the available data from isogenic strains revealed inconsistencies with this predicted model (Berling *et al.*, 2013). It has been suggested that other resistance mechanisms could exist (Jehle *et al.*, 2011)

Table 1. Biological efficiency of two CpGV isolates on three laboratory colonies.

Virus	Insect	LD ₅₀	Conf Int 95%	LD ₉₀	Conf Int 95%	Slope	χ ²
CpGV-M	S _v	34	24 - 46	125	86 - 239	2.271±0.387	3.782
	CpNPP	13	7 - 23	223	111 - 653	1.041±0.087	5.9895
	R _{GV}	7122	1196 - 37429	1.83x10 ⁶	2.15x10 ⁵ - 3.68x10 ⁸	0.531±0.072	6.5308
CpGV-R5	S _v	32	4 - 106	438	127 - 19402	0.126±0.175	8.4499
	CpNPP	7	03 - 12	60	28 - 279	1.355±0.127	11.425
	R _{GV}	22	14 - 33	410	240 - 845	1.011±0.102	3.622

Table 1 present the results of bioassays on the three *C. pomonella* colonies. As expected, the CpGV-M isolate is efficient on susceptible insects (CpNPP and S_v) but not on resistant insects (R_{GV}). The CpGV-R5 isolate is efficient in all three colonies.

The comparisons of efficiency between each modality indicate that each virus displays a specific action on each insect colony excluding CpGV-R5 which shows the same effect on S_V and R_{GV} (Equality hypothesis: $P > 0.05$, $\chi^2 = 1.04$, $df = 2$, tail probability = 0.596; Parallelism hypothesis: $P > 0.05$, $\chi^2 = 0.34$, $df = 1$, tail probability = 0.559). This result could reflect the shared genetic background of S_V and R_{GV} colonies (Berling *et al.* 2009).

When comparing the dose-réponse to the CpGV-M isolate of CpNPP and S_V , small but significant differences are found (Equality hypothesis: $P < 0.05$, $\chi^2 = 24.80$, $df = 2$, tail probability = 0.00; Parallelism hypothesis: $P < 0.05$, $\chi^2 = 17.56$, $df = 1$, tail probability = 0.00), whereas CpGV-R5 virus impacts these colonies on a similar way (Parallelism hypothesis: $P > 0.05$, $\chi^2 = 1.02$, $df = 1$, tail probability = 0.314) but with different intensity (Equality hypothesis: $P < 0.05$, $\chi^2 = 30.40$, $df = 2$, tail probability = 0.00). CpNPP appears to be a laboratory colony “fully susceptible” to both CpGV isolates, while S_V and its derivate, R_{GV} , have a lower susceptibility level. As seen in Figure 1, although the global trends are similar for S_V and CpNPP, at low multiplicity of infection CpNPP is more susceptible than S_V to both virus isolates.

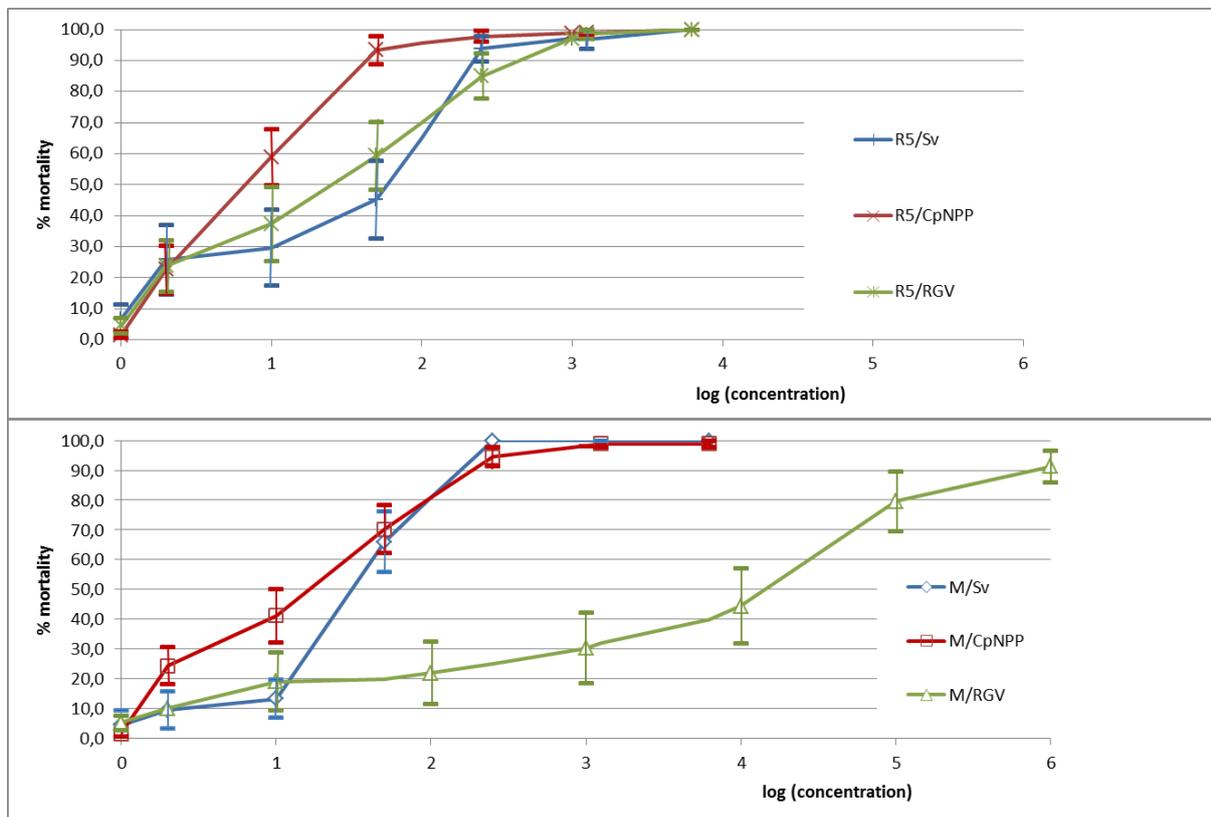


Figure 1. Dose/mortality plots for the two virus isolates on three insect colonies.

These differences are probably the reflect of differences in the ways the two viruses control the infection cycle in their hosts. In condition of low virus prevalence, the genetic background of S_V would be enough for blocking an outbreak.

In other baculoviruses, variability on the susceptibility of natural populations to the infection with a virus isolate has been described. (Briese, 1986; Abot *et al.*, 1996). The possibility of selection of a population with reduced susceptibility to CpGV based on this

second mechanism remains open. This second mechanism would not necessarily discriminate isolates in a similar way as the resistance actually present in European orchards.

Acknowledgements

The research leading to these results have received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2011) under grant agreement n° 211606. B.G. is recipient of a French ANRT doctoral grant.

References

- Abot, A. R., Moscardi, F., Fuxa, J. R. Sosa-Gómez, D. R. & Richter, A.; R. 1996. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biol. Control* 7:528-534.
- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K.E., Gund, N.A., Reineke, A., Zebitz, C.P.W., Heckel, D.G., Huber, J. & Jehle, J.A. 2007: Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 318: 1916-1918.
- Berling, M., Sauphanor, B., Bonhomme, A., Siegwart, M. & López-Ferber, M. 2013. A single sex linked dominant gene does not fully explain the codling moth's resistance to granulovirus. *Pest Manag. Sci.* doi: 10.1002/ps.3493.
- Berling, M., Blachere-Lopez, C., Soubabere, O., Léry, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B. & López-Ferber, 2009. M. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *App. Env. Microbiol.* 75: 925-930.
- Besse, S., Crabos, L., Soubabère, O., Bonhomme, A., López-Ferber, M., Berling, M., Sauphanor, B. & Ondet, S-J. 2011. The new CpGV-R5 variant overcomes the codling moth resistance to the virus. *IOBC-WPRS Bull.* 66: 397-400.
- Briese, D. T. 1986. Insect resistance to baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses, Vol.II*, eds. Federici and Granados: 89-108.
- Crook, N. E., Spencer, R. A., Payne, C. C. & Leisy, D. J. 1985. Variation in *Cydia pomonella* Granulosis Virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J. Gen. Virol.* 66:2423-2430.
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J. C. & Idrissi Ammari. A. M. 1981. Progrès réalisés dans l'élevage du carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* 1:59-64.
- Jehle, J. A. & Schmitt, A. 2009. Resistance to baculoviruses – new answers to an old question. *IOBC-WPRS Bull.* 45:125-127.
- Jehle, J. A., Schulze-Bopp, S., Fritsch, E. & Undorf-Spahn, K. 2011. Resistance of codling moth to *Cydia pomonella granulovirus* – are there two types or resistance? *IOBC-WPRS Bull.* 66: 405.
- Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, J.-F., Reyes, M., Delnatte, J. & Allemoz, P. 2006: Carpocapse des pommes. Cas de résistance au virus de la granuloze en vergers biologique. *Phytoma Def. Veg.* 590: 24-27.
- Tanada, Y. 1964. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (olethreutidae, Lepidoptera). *J. Invertebr Pathol.* 6:378-380.

Annexe 3

Sequence analysis of CpGV-R5 isolate, able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome

Benoît Graillet, Samantha Besse, Christine Blachere-López, Jérôme Olivares,
Myriam Siegwart, & Miguel López-Ferber.

IOBC/WRPS Bulletin, 2013, Vol 90, pp. 195-199.

Sequence analysis of CpGV-R5 isolate, able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome.

Benoît Graillot¹⁻², Samantha Besse², Christine Blachère-Lopez¹⁻³, Jérôme Olivares⁴, Myriam Siegwart⁴, and Miguel Lopez-Ferber¹

¹LGEI, Ecole des Mines d'Alès, Institut Mines-Telecom et Université de Montpellier Sud de France;

²NPP (Arysta LifeScience), 35 Avenue Léon Blum, 64000 Pau, France;

³INRA, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France;

⁴INRA, Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

Abstract: The CpGV-R5 isolate is able to overcome resistant populations of codling moth to the CpGV-M isolate. The complete sequences of CpGV-R5 and the CpGV-M used for industrial production at Natural Plant Protection have been determined. Among the differences found, some are specific to the R5 isolate, others are common to various isolates able to overcome the resistance, like modification on the p38 gene product.

Key words: Granulovirus, CpGV, resistance, sequence analysis

Introduction

The first isolate of the *Cydia pomonella granulovirus*, CpGV was found in Mexico (CpGV-M (Tanada, 1964)). CpGV is used in biological control against codling moth. In Europe, all commercial formulations of CpGV are derived from the same CpGV-M isolate (Lacey *et al.*, 2008).

In 2005, first cases of resistance were detected in Germany (Fritsch *et al.*, 2005) and France (Sauphanor *et al.*, 2006). Researches conducted in various laboratories and companies resulted in the characterization of various virus isolates that could control the CpGV-M resistant insects (Berling *et al.*, 2009; Eberle *et al.*, 2009; Rezapanah *et al.*, 2008; Zingg, 2011). Among them, the CpGV-R5 has been selected for commercialization by NPP (Besse *et al.*, 2011).

The complete sequence of CpGV-M is known (NC_002816.1)(Luque *et al.*, 2001). Comparison between the sequences of these new isolates can allow the identification of the virus genes involved in resistance by-passing, in a first step to unveil the modification in the host-virus relationships in CpGV-M resistant insects. This approach has been used with various CpGV isolates (Eberle *et al.*, 2009).

In this study the sequences of the CpGV-M isolate presently used by us (CpGV-M_{NPP}) and the CpGV-R5 isolate have been determined and compared to the reference sequence of CpGV-M1, (Luque *et al.*, 2001).

Material and methods

Virus amplification and DNA extraction

All viruses used were provided by Natural Plant Protection (Arysta LifeScience) NPP-R1 was previously described by Berling and coworkers (Berling *et al.*, 2009). NPP-R5 was derived from NPP-R1 through selection by passaging on RGV resistant insects. CpGV-M_{NPP} is the stock used for Carpovirusine TM production. It comes from the original mexican isolate (Klingauf, 2006). All viruses were amplified on SV larvae, as previously described. Occlusion bodies were purified and viral DNA extracted as described. (Berling *et al.*, 2009).

Sequencing

Sequencing was carried out by the GENTYANE platform of genotyping (INRA UMR 1095, Clermond-Ferrand, France) using a shotgun approach. For closing the remaining sequencing gaps, a primer walking strategy was used. Purified PCR amplicons were sequenced by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany).

PCR amplification and gel purification of amplicons

Specific primers were designed close to the borders of the gaps in the DNA sequences, using the sequence of CpGV-M previously published (Luque *et al.*, 2001) as a reference. PCR reactions were carried out using standard protocols. The presence of the amplicon was controlled on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplicons were gel purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) following manufacturer instructions.

Genome assembly and sequence analysis

The sequences were assembled and analysed using Clone manager V9 (SCI-ED software). Web available programs were used for sequence comparison.

Results and discussion

Table 1. Main differences observed between CpGV-M1 and CpGV-R5. Δ indicates deletions and ▼ indicates insertions.

CpGV-R5 ORF	CpGV-M1 ORF	name	position in CpGV-M1	length (nt)	length (aa)	position and type of aa differences
7	7	<i>ie-1</i>	3392<4858	1479	493	E367D, ▼VPHW463, R466I
24	24	<i>pe38</i>	18574<19722	1125	374	Δ312-319, K355Q, Q355K
32	32		27331>28671	1341	447	Δ14-21, L71M, ▼TEEEIQNT120, V250A, V264A, M429T
46	46	<i>mp-nase</i>	36835<38472	1641	546	V85L, E177D, ▼G472
62	62		51047<51616	507	169	D38Y, Δ122-136, Δ157, D158E, Δ159-162
70	70		56506<57060	876	292	L20I, ▼S23, ▼D34, ▼EYQ37, V38S, D39E, ▼Y47, P48Q, S51D, ▼H52, P53Y, S54E, V55P, D57E, V59E, S60P, E61S, Y62S, ▼S64, ΔS81
87	87	<i>lef-5</i>	68491<69219	726	242	A87L, E88R, N89T, P90T

Sequence comparison between CpGV-M and CpGV-M-NPP

The CpGV-M_{NPP} sequence is similar to the CpGV-M1 sequence (Luque *et al.*, 2001). Thirty one changes affecting ORFs were found, some contributing to fuse two contiguous ORFs.

The most important change is located in ORF 32, with a series of substitutions. All SNPs in *polh* and *lef8* of CpGV-M_{NPP} are conserved. (Eberle *et al.*, 2009). Fourteen other differences are detected in non-coding regions. A 16 nt insertion is found between ORFs 15 and 16, and a variability region is located between ORFs 50 and 51.

Sequence comparison between CpGV-M-1 and CpGV-R5

CpGV-R5 appears to be different to the 4 other classes of CpGV isolates proposed in function of the nucleotide variability at granulin (*polh*) and *lef-8* genes (Eberle *et al.*, 2009). CpGV-R5 is similar to B class (as CpGV-E2) on granulin and to A class when considering *lef-8*.

The isolate CpGV-R5 has 124 differences in respect to CpGV-M1 (Luque *et al.*, 2001). Eberle (Eberle, 2010) has compared CpGV-M, CpGV-I12 and CpGV-S. Two thirds of the 66 ORFs conserved between CpGV-M-1 and CpGV-S are also conserved in CpGV-R5. Only one third presents differences, and among these only two ORFs (ORF25 and ORF26) arbors major changes. The most significant differences are presented in table 1. The detail of the PE38 and IE-I sequences for each virus is presented in Figure 1.

IE-1 CpGV-M1	351	KELQNLKNEYGTEADV	EEFMRLSVAHPRGDVVFNMKVRD	TNTQRYRINCF
IE-1 CpGV-MNPP	351	KELQNLKNEYGTEADV	EEFMRLSVAHPRGDVVFNMKVRD	TNTQRYRINCF
IE-1 CpGV-I01	351	KELQNLKNEYGTEADV	EEFMRLSVAHPRGDVVFNMKVRD	TNTQRYRINCF
IE-1 CpGV-R1.8	351	KELQNLKNEYGTEADV	EEFMRLSVAHPRGDVVFNMKVRD	TNTQRYRINCF
IE-1 CpGV-R5	351	KELQNLKNEYGTEADV	EEFMRLSVAHPRGDVVFNMKVRD	TNTQRYRINCF
IE-1 CpGV-M1	401	RMDSVHVWVNSMVYSDV	QQFNLKKMIQRHRWGTHHILQFDY	MYNSMMSKL
IE-1 CpGV-MNPP	401	RMDSVHVWVNSMVYSDV	QQFNLKKMIQRHRWGTHHILQFDY	MYNSMMSKL
IE-1 CpGV-I01	401	RMDSVHVWVNSMVYSDV	QQFNLKKMIQRHRWGTHHILQFDY	MYNSMMSKL
IE-1 CpGV-R1.8	401	RMDSVHVWVNSMVYSDV	QQFNLKKMIQRHRWGTHHILQFDY	MYNSMMSKL
IE-1 CpGV-R5	401	RMDSVHVWVNSMVYSDV	QQFNLKKMIQRHRWGTHHILQFDY	MYNSMMSKL
IE-1 CpGV-M1	451	HAEVSKLVIRYV----	LSRRSFDLLQND	CSKLSYKKIVYE
IE-1 CpGV-MNPP	451	HAEVSKLVIRYV----	LSRRSFDLLQND	CSKLSYKKIVYE
IE-1 CpGV-I01	451	HAEVSKLVIRYV----	LSRRSFDLLQND	CSKLSYKKIVYE
IE-1 CpGV-R1.8	451	HAEVSKLVIRYV----	LSRRSFDLLQND	CSKLSYKKIVYE
IE-1 CpGV-R5	451	HAEVSKLVIRYV	VPHWLSI	RSFDLLQND
PE38 CpGV-M1	101	PRVQTAERNYNEFVGAIR	NAAGEPMEAEQES	PANEPADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-MNPP	101	PRVQTAERNYNEFVGAIR	NAAGEPMEAEQES	PANEPADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-I01	101	PRVQTAERNYNEFVGAIR	NAAGEPMEAEQES	PANEPADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-R1.8	101	PRVQTAERNYNEFVGAIR	NAAGEPMEAEQES	PANEPADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-R5	101	PRVQTAERNYNEFVGAIR	NAAGEPMEAEQES	PANEPADYNSMDDMINN
Perfect match between all five sequences from 150 to 300				
PE38 CpGV-M1	301	TEDDITKSVANDTVDD	TVDVDDT	IMRDDS
PE38 CpGV-MNPP	301	TEDDITKSVANDTVDD	TVDVDDT	IMRDDS
PE38 CpGV-I01	301	TEDDITKSVAN-----	DTVDDT	IMRDDS
PE38 CpGV-R1.8	301	TEDDITKSVAN-----	DTVDDT	IMRDDS
PE38 CpGV-R5	301	TEDDITKSVAN-----	DTVDDT	IMRDDS
PE38 CpGV-M1	351	YLNKQKFISHQYIVKSL	TDSLRRATKKPIKY	
PE38 CpGV-MNPP	351	YLNKQKFISHQYIVKSL	TDSLRRATKKPIKY	
PE38 CpGV-I01	343	YLNKQKFISHQYIVKSL	TDSLRRATKKPIKY	
PE38 CpGV-R1.8	343	YLNKQKFISHQYIVKSL	TDSLRRATKKPIKY	
PE38 CpGV-R5	343	YLNKQKFISHQYIVKSL	TDSLRRATKKPIKY	

Figure 1. Partial alignment of the predicted amino acid sequences of various isolates of CpGV at the ORF7 (IE-1) and ORF24 (PE38).

Previous work (Eberle, 2010) suggested an association between PE38 (ORF24) variation and virus ability to bypass the resistance. Figure 1 details the differences found at the PE38 (CpGV-M1 ORF 24) between the various isolates analyzed in this paper. The main deletion previously described for CpGV-I01, is also conserved in CpGV-R1.8 and its derivative, CpGV-R5. Two specific aminoacid changes differentiate these last isolates from all the others, K355Q and Q362K.

Acknowledgements

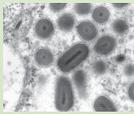
The research leading to these results have received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2011) under grant agreement n° 211606. B.G. is recipient of a French ANRT doctoral grant.

References

- Berling, M., Blachere-Lopez, C., Soubabere, O., Lery, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B. & Lopez-Ferber, M. 2009. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *App. Env. Microbiol.* 75: 925-30.
- Besse, S., Crabos, L., Soubabère, O., Bonhomme, A., López-Ferber, M., Berling, M., Sauphanor, B. & Ondet, S-J. 2011. The new CpGV-R5 variant overcomes the Codling moth resistance to the virus. *IOBC-WPRS Bull.* 66: 397-400.
- Eberle, K. E., 2010. Novel isolates of *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV): deciphering the molecular mechanism for overcoming CpGV resistance in codling moth (*Cydia pomonella*). PhD thesis. Johannes Gutenberg University. Mainz. Germany. 185 pp.
- Eberle, K. E., Sayed, S., Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S. & Jehle, J. A. 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella granulovirus*. *J. Gen. Virol.* 90: 662-671.
- Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Zebitz, C. P. W. & Huber, J. 2005: Apfelwickler-Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 57, 29-34.
- Klingauf, F. 2006. Laudatio für Herrn Direktor und Professor a.D. Dr. Erich Dickler und Herrn Direktor und Professor Dr. Jürg Huber anlässlich der Verleihung der Karl-Escherich-. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie: Band 15 2006*, 11 - 17
- Lacey L. A., Thompson D., Vincent C., & Arthurs, S. P. 2008. Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Science and Technology*, 18, 639-663.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R., & Winstanley, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella granulovirus* genome. *J Gen Virol* 82, 2531- 47.
- Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S., Huber, J. & Jehle, J. A. (2008). Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella granulovirus* from Iran. *J Pest Sci* 81, 187–191.
- Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, J.-F., Reyes M., Delnatte, J., & Allemoz, P. 2006. Carposcapse des pommes: cas de résistance au virus de la granuloose en vergers biologiques. *Phytoma Def. Veg.* 590: 24-27.
- Tanada, Y. 1964. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (olethreutidae, Lepidoptera). *J. Invertebr Pathol.* 6:378–380.
- Zingg, D., Züger, M., Bolhalder, F & Andermatt, M. 2011. Use of resistance overcoming CpGV isolates and CpGV resistance situation of the codling moth in Europe seven years after the first discovery of resistance to CpGV-M. *IOBC-WPRS Bull.* 66: 401-404.

Annexe 4

Posters



Sequence analysis of CpGV-R5 isolate, able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome.

Benoît Graillot^{1,2}, Samantha Besse², Christine Blachère-Lopez^{1,3}, Jérôme Olivares⁴, Myriam Siegwart⁴, and Miguel Lopez-Ferber¹

¹LGEI, Ecole des Mines d'Alès, Institut Mines-Telecom et Université de Montpellier Sud de France; ²NPP (Arysta LifeScience), 35 Avenue Léon Blum, 64000 Pau, France; ³INRA, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès, France; ⁴INRA, Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France;



Introduction

The first isolate of the *Cydia pomonella granulovirus*, CpGV was found in Mexico (CpGV-M) [1] and is used as a biological control agent against the codling moth. In Europe, all commercial formulations of CpGV up to 2005 were derived from the same CpGV-M isolate [2]. Resistance towards this isolate was identified in 2005, in both Germany [3] and France [4], giving rise to various virus isolates being characterised by separate laboratories, with the aim of controlling CpGV-M resistant insects [5,6,7,8]. Among them, the CpGV-R5 has been selected for commercialization by NPP [9]. The complete sequence of CpGV-M is known (NC_002816.1) [10]. Comparison between the sequences of these new isolates can allow the identification of the virus genes involved in overcoming resistance, as a first step in unveiling the modification in the host-virus relationships amongst CpGV-M resistant insects. This approach has been used with various CpGV isolates [6]. In this study, both the sequences of the CpGV-M isolate (currently used by us, CpGV-M_{NPP}) and the CpGV-R5 isolate, have been determined and compared to the reference sequence of CpGV-M [10] named CpGV-M1 in the sequences alignments.

Material and methods

Virus amplification and DNA extraction

All viruses used were provided by Natural Plant Protection (Arysta LifeScience) NPP-R1 was previously described by Berling and coworkers [5]. NPP-R5 was derived from NPP-R1 through selection by passing on RGV resistant insects. CpGV-M_{NPP} is the stock used for CarpoVirusine™ production. It comes from the original mexican isolate [11]. All viruses were amplified on susceptible SV larvae, as previously described. Occlusion bodies were purified and viral DNA extracted as described [5].

Sequencing

Sequencing was carried out by the GENTYANE platform of genotyping (INRA UMR 1095, Clermond-Ferrand, France) using a shotgun approach. For closing the remaining sequencing gaps, a primer walking strategy was used. Purified PCR amplicons were sequenced by Eurofins MWG (Ebersberg, Germany).

PCR amplification and gel purification of amplicons

Specific primers were designed close to the borders of the genes in the DNA sequences, using the sequence of CpGV-M previously published [10] as a reference. PCR reactions were carried out using standard protocols. The presence of the amplicon was controlled on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplicons were gel purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) following manufacturer instructions.

Genome assembly and sequence analysis

The sequences were assembled and analysed using Clone manager V9 (SCI-ED software). Programs available online were used for sequence comparison.

Results and discussion

Sequence comparison between CpGV-M and CpGV-M-NPP

The CpGV-M_{NPP} sequence is similar to the CpGV-M1 sequence [10]. Thirty one changes affecting ORFs were found, some contributing to fuse two adjacent ORFs. The most important change is located in ORF 32, with a series of substitutions. All SNPs in *polh* and *lef8* of CpGV-M_{NPP} are conserved [6]. Fourteen other differences were detected in non-coding regions. A 16 nt insertion is found between ORFs 15 and 16, and a variability region is located between ORFs 50 and 51.

Sequence comparison between CpGV-M-1 and CpGV-R5

CpGV-R5 appears to be different to the 4 other classes of CpGV isolates dictated by the nucleotide variability at granulin (*polh*) and *lef-8* genes [6]. CpGV-R5 is similar to B class (as CpGV-E2) on granulin and to A class when considering *lef-8*.

Main differences observed between CpGV-M1 and CpGV-R5. Δ indicates deletions and ▼ indicates insertions.

CpGV-R5 ORF	CpGV-M1 ORF	name	Position in CpGV-M1	length (nt)	length (aa)	position and type of aa differences
7	7	le-1	3392<4858	1479	493	E367D, ▼VPHW463, R466I
24	24	pe38	18574<19722	1125	374	Δ312-319, K355Q, Q355K
32	32		27331>28671	1341	447	Δ14-21, L71M, ▼TEEEICQNT120, V250A, V264A, M429T
46	46	mp-nase	36835<38472	1641	546	V85L, E177D, ▼G472
62	62		51047<51616	507	169	D38Y, Δ122-136, Δ157, D158E, Δ159-162
70	70		56506<57060	876	292	L20I, ▼S23, ▼D34, ▼EYQ37, V38S, D39E, ▼Y47, P48Q, S51D, ▼H52, P53Y, S54E, V55P, D57E, V59E, S60P, E61S, Y62S, ▼S64, ΔS81
87	87	lef-5	68491<69219	726	242	A87L, E88R, N89T, P90T

The isolate CpGV-R5 has 124 differences in respect to CpGV-M1 [10]. Eberle [12] has compared CpGV-M, CpGV-I12 and CpGV-S. Two thirds of the 66 ORFs, conserved between CpGV-M-1 and CpGV-S, are also conserved in CpGV-R5. Only one third presents differences, and among these only two ORFs (ORF25 and ORF26) harbors major changes. The most significant differences are presented in this table.

Previous work [12] suggested an association between PE38 (ORF24) variation and virus ability to bypass the resistance. This figure depicts the differences found at the PE38 (CpGV-M1 ORF 24) and IE-1 (CpGV-M1 ORF 7) between the various isolates analyzed. The main deletion previously described for CpGV-I01 is also conserved in CpGV-R1.8, and its derivative CpGV-R5. Two specific amino-acid changes differentiate these last isolates from all the others, K355Q and Q362K.

```

IE-1 CpGV-M1      351 KEIQNLKNEYGTADVEEPRLSVAHPRGDFVNMVRODTNQRVRLNCF
IE-1 CpGV-MNPP   351 KEIQNLKNEYGTADVEEPRLSVAHPRGDFVNMVRODTNQRVRLNCF
IE-1 CpGV-I01    351 KEIQNLKNEYGTADVEEPRLSVAHPRGDFVNMVRODTNQRVRLNCF
IE-1 CpGV-R1.8   351 KEIQNLKNEYGTADVEEPRLSVAHPRGDFVNMVRODTNQRVRLNCF
IE-1 CpGV-R5     351 KEIQNLKNEYGTADVEEPRLSVAHPRGDFVNMVRODTNQRVRLNCF
  
```

```

IE-1 CpGV-M1      401 RMDSVVWVNSMVSVDVQVFNLEKMIQRKRGTRHLLQDFYVNSMSEKEL
IE-1 CpGV-MNPP   401 RMDSVVWVNSMVSVDVQVFNLEKMIQRKRGTRHLLQDFYVNSMSEKEL
IE-1 CpGV-I01    401 RMDSVVWVNSMVSVDVQVFNLEKMIQRKRGTRHLLQDFYVNSMSEKEL
IE-1 CpGV-R1.8   401 RMDSVVWVNSMVSVDVQVFNLEKMIQRKRGTRHLLQDFYVNSMSEKEL
IE-1 CpGV-R5     401 RMDSVVWVNSMVSVDVQVFNLEKMIQRKRGTRHLLQDFYVNSMSEKEL
  
```

```

IE-1 CpGV-M1      451 HAEVSKLIVIRVY----LSRSDFLLQDCSKLKYKVIYVE
IE-1 CpGV-MNPP   451 HAEVSKLIVIRVY----LSRSDFLLQDCSKLKYKVIYVE
IE-1 CpGV-I01    451 HAEVSKLIVIRVY----LSRSDFLLQDCSKLKYKVIYVE
IE-1 CpGV-R1.8   451 HAEVSKLIVIRVY----LSRSDFLLQDCSKLKYKVIYVE
IE-1 CpGV-R5     451 HAEVSKLIVIRVY----LSRSDFLLQDCSKLKYKVIYVE
  
```

```

PE38 CpGV-M1      101 FRVQTAERNVNEFVGLRNAAGEPHEAQESFANEPAADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-NPP     101 FRVQTAERNVNEFVGLRNAAGEPHEAQESFANEPAADYNSMDDMINN
PE38 CPOV-I01     101 FRVQTAERNVNEFVGLRNAAGEPHEAQESFANEPAADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-R1.8   101 FRVQTAERNVNEFVGLRNAAGEPHEAQESFANEPAADYNSMDDMINN
PE38 CpGV-R5     101 FRVQTAERNVNEFVGLRNAAGEPHEAQESFANEPAADYNSMDDMINN
  
```

Perfect match between all five sequences from 150 to 300

```

PE38 CpGV-M1      301 TEDDTIKSVANDVDDVDDVDDIMRDSILVANDTFRSKYKILKRR
PE38 CpGV-MNPP   301 TEDDTIKSVANDVDDVDDVDDIMRDSILVANDTFRSKYKILKRR
PE38 CpGV-I01    301 TEDDTIKSVAN-----DVTDDIMRDSILVANDTFRSKYKILKRR
PE38 CpGV-R1.8   301 TEDDTIKSVAN-----DVTDDIMRDSILVANDTFRSKYKILKRR
PE38 CpGV-R5     301 TEDDTIKSVAN-----DVTDDIMRDSILVANDTFRSKYKILKRR
  
```

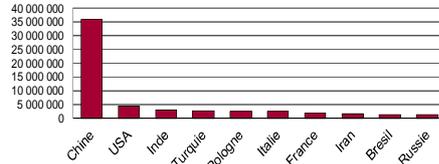
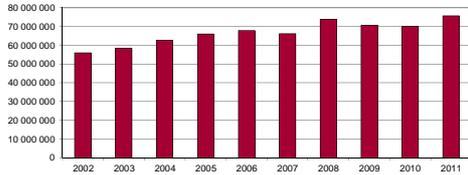
```

PE38 CpGV-M1      351 YLNLKQKFIHQVIVKSLTDSLRATKPKFY
PE38 CpGV-MNPP   351 YLNLKQKFIHQVIVKSLTDSLRATKPKFY
PE38 CpGV-I01    343 YLNLKQKFIHQVIVKSLTDSLRATKPKFY
PE38 CpGV-R1.8   343 YLNLKQKFIHQVIVKSLTDSLRATKPKFY
PE38 CpGV-R5     343 YLNLKQKFIHQVIVKSLTDSLRATKPKFY
  
```

1. Tamada, Y. 1964. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (Linnaeus) (olethreutidae, Lepidoptera). J. Invertebr Pathol. 6:378-380.
2. Lazey, L. A., Thompson, D., Venzel, C. & Arthur, S. P. 2009. Codling moth granulovirus: a comprehensive review. Biocotoni Science and Technology. 18. 639-663.
3. Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzie, J., Zebitz, C. P. W. & Huber, J. 2005. Apfelwickler-Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler/Populations. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 57, 29-34.
4. Sauphanor, B., Berling, M., Toubon, J.-F., Reyes, M., Delnatte, J., & Allemon, P. 2006. Carposcap des pommes: cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques. Phytoma Def. Veg. 590: 24-27.
5. Berling, M., Blachère-Lopez, C., Soubatière, O., Lery, X., Bonhomme, A., Sauphanor, B. & Lopez-Ferber, M. 2009. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. Ann. Entomol. Microbiol. 75: 925-30.
6. Eberle, K. E., Sayed, S., Rezapannah, M., Shojai-Estabragh, S. & Jehle, J. A. 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella granulovirus*. J. Gen. Virol. 90: 662-671.
7. Rezapannah, M., Shojai-Estabragh, S., Huber, J. & Jehle, J. A. (2008). Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella granulovirus* from Iran. J. Pest Sci 81, 187-191.
8. Zingg, D., Zuger, M., Böhmler, F. & Andermat, M. 2011. Use of resistance overcoming CpGV isolates and CpGV resistance situation of the codling moth in Europe seven years after the first discovery of resistance to CpGV-M. IOBC-WPRS Bull. 66: 401-404.
9. Besse, S., Crabos, L., Soubatière, O., Bonhomme, A., Lopez-Ferber, M., Berling, M., Sauphanor, B. & Onder, S.-J. 2011. The new CpGV-R5 variant overcomes the Codling moth resistance to the virus. IOBC-WPRS Bull. 66: 397-400.
10. Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R., & Winstanley, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella granulovirus* genome. J. Gen. Virol. 82, 2531-47.
11. Königstorfer, F. 2006. Laudatio für Herrn Direktor und Professor a. D. Dr. Erich Dickler und Herrn Direktor und Professor Dr. Jürgen Huber anlässlich der Verleihung der Karl-Escherich-Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie. Band 15 2006, 11 - 17
12. Eberle, K. E., 2010. Novel isolates of *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV): deciphering the molecular mechanism for overcoming CpGV resistance in codling moth (*Cydia pomonella*). PhD thesis. Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany, 189 pp.

The research leading to these results, is a result of funding received from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2011) under grant agreement n° 211008. B.G. is recipient of a French ANRT doctoral grant.

Contexte : Production des pommes et impacts environnementaux



Les 10 principaux pays producteurs de pomme fournissent 75% de la production mondiale: **56 785 000 t**.

La pomme fait partie des fruits et légumes les plus traités par les pesticides chimiques et les plus consommés dans le monde. **Son impact sanitaire et environnemental est donc un problème majeur.**



Objectif : Diminuer la pollution par l'utilisation de bio-insecticide

Ravageur : Carpocapse de la pomme (*Cydia pomonella*)

Principal ravageur des vergers de pommiers et poiriers à travers le monde. Résistant à la plupart des insecticides chimiques.



Résistance du carpocapse aux insecticides chimiques

Enormes pertes économiques

Moyen de lutte: *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV)



Mode d'action du virus:

- 1 - Les granules viraux (Gv) sont ingérés par les larves dès l'éclosion.
- 2 - Les Gv sont hydrolysés dans les cellules digestives des larves.
- 3 - La multiplication des Gv entraîne l'arrêt de l'alimentation des larves.
- 4 - Multiplication des Gv dans les cellules.
- 5 - Mort des larves par septicémie.

Spécifique à un ou deux hôtes. Sans danger pour les autres êtres vivants.

Très bon agent de biocontrôle



Problématique: la résistance

Après plus de 20 ans d'utilisation à grande échelle d'un isolat viral (CpGV-M), des populations de carpocapses résistantes ont été détectées en champs. Pour remédier à ce problème, deux solutions ont été envisagées : l'utilisation d'un nouveau variant naturel capable de contourner la résistance ou la sélection, sur larves résistantes, d'isolats viraux existants. **Le variant CpGV-M n'est pas capable de se répliquer dans les insectes résistants.** Le résultat de ces travaux fut la mise au point, par passages successifs sur larves résistantes, d'un isolat viral capable de contourner la résistance: l'isolat CpGV-R5.

Enjeu : garantir la durabilité (pérennité) de cette méthode

Trouver les zones variables du génome viral responsables du contournement de la résistance

Principales différences observées entre le génome de CpGV-M et CpGV-R5. Δ indique une délétion et ▼ indique une insertion.

CpGV-R5 ORF	CpGV-M1 ORF	nom	Position in CpGV-M1	taille (nt)	taille (aa)	Position et type de différences d'aa
7	7	le-1	3392-4858	1479	493	E367D, ▼VPHW463, R466I
24	24	pe38	18574-19722	1125	374	Δ312-319, K355Q, Q355K
32	32		27331-28671	1341	447	Δ14-21, L74M, ▼TEEEQQNT120, V250A, V264A, MKGT
46	46	mp-nase	36835-38472	1641	546	V85L, E177D, ▼G47Z
82	82		51047-51616	507	169	D38Y, Δ122-136, Δ157, Δ158E, Δ159-162
70	70		56506-57060	876	292	L20L, ▼S23, ▼D34, ▼EVC07, V38S, D39E, ▼Y47, P48Q, S61D, M162, P63Y, S64E, V56P, D67E, V58E, S60P, E61S, Y62S, ▼S64, Δ58I
87	87	Lef-5	68491-69219	726	242	Δ87L, E88R, N89T, P90T

L'ADN viral de 5 isolats a été séquencé, et les génomes de CpGV-M et CpGV-R5 comparés. L'isolat CpGV-R5 présente 124 différences par rapport à CpGV-M. Des études précédentes ont comparé CpGV-M, CpGV-112 et CpGV-S, deux tiers des 66 ORFs, conservées entre CpGV-M et CpGV-S, sont aussi conservées dans CpGV-R5. Seul un tiers présente des différences, et parmi elles, seules deux ORFs (25 et 26) présentent de fortes modifications. **Les principales différences sont listées dans le tableau de gauche.**

PE38 CpGV-M1	101	PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI
PE38 CpGV-NPP	101 <td>PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI</td>	PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI
PE38 CpGV-101	101 <td>PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI</td>	PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI
PE38 CpGV-R1.8	101 <td>PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI</td>	PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI
PE38 CpGV-R5	101 <td>PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI</td>	PRVQTARSNYNEFVGAIRNAAGEPMEARQESPANEPAADYNSMDDMINI

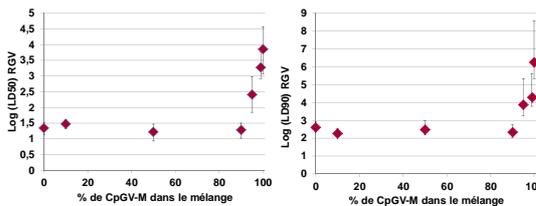
Alignement parfait entre les cinq séquences de 150 à 300

PE38 CpGV-M1	301	TEDDITKSVANVDVDTVDVDTIMRDSLMAVANDTPSRKSYKILKRR
PE38 CpGV-NPP	301	TEDDITKSVANVDVDTVDVDTIMRDSLMAVANDTPSRKSYKILKRR
PE38 CpGV-101	301	TEDDITKSVANVDVDTVDVDTIMRDSLMAVANDTPSRKSYKILKRR
PE38 CpGV-R1.8	301	TEDDITKSVANVDVDTVDVDTIMRDSLMAVANDTPSRKSYKILKRR
PE38 CpGV-R5	301	TEDDITKSVANVDVDTVDVDTIMRDSLMAVANDTPSRKSYKILKRR
PE38 CpGV-M1	351	YLNLEQKPFISHQYIVKSLTSLERATKPKKY
PE38 CpGV-NPP	351	YLNLEQKPFISHQYIVKSLTSLERATKPKKY
PE38 CpGV-101	343	YLNLEQKPFISHQYIVKSLTSLERATKPKKY
PE38 CpGV-R1.8	343	YLNLEQKPFISHQYIVKSLTSLERATKPKKY
PE38 CpGV-R5	343	YLNLEQKPFISHQYIVKSLTSLERATKPKKY

Différences observées en acides aminés entre les génomes de 5 isolats viraux pour le gène Pe38.

Des études précédentes semblaient relier la variation de Pe38 à la faculté du virus à contourner la résistance. Sur la figure ci-contre, **on observe que les modifications de Pe38 sont toujours les mêmes pour les virus contournant la résistance** ce qui confirme cette hypothèse. Pour CpGV-R5, deux amino-acides spécifiques changent, et différencient cet isolat des autres (K355Q et Q362K).

Augmenter la variabilité génétique du virus par utilisation de mélanges viraux



Efficacité de contrôle des insectes résistants RGV en fonction des proportions de chaque virus, CpGV-M et CpGV-R5, dans le mélange.

La composition de chaque mélange viral a été déterminée par PCR quantitative grâce à des marqueurs spécifiques. Le virus produit par des larves (sensibles et résistantes) infectées et tuées par ces mélanges a aussi été analysé (Tableau ci-contre). Pour les mélanges, les proportions correspondent à la composition théorique. **Pour les larves mortes, nous trouvons des marqueurs des deux virus, même sur les insectes résistants, indiquant que CpGV-M est capable de se répliquer sur des insectes non permmissifs, à la condition que CpGV-R5 soit présent.**

Des mélanges viraux ont été préparés en faisant varier les quantités de CpGV-M et CpGV-R5 comme décrit dans le tableau ci-dessous. L'efficacité de ces mélanges (dose tuant 50 et 90% de la population) par rapport à la quantité de CpGV-M est représentée en figure ci-contre.

Un contrôle similaire est atteint avec des compositions variables (0 à 90% de CpGV-M) sur larves résistantes. **La présence d'une très faible proportion de CpGV-R5 ajoutée à CpGV-M est suffisante pour assurer un contrôle efficace des insectes résistants.**

Analyse par PCR quantitative de la composition génétique des différents mélanges et des larves mortes sensibles (Sv) et résistantes (RGV) à CpGV-M suite à l'ingestion de ces mélanges.

Productions	99%M-1%R5		95%M-5%R5		90%M-10%R5		50%M-50%R5		10%M-90%R5	
	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R	%M	%R
mélange	99	1	95	5	90	10	50	50	10	90
Mortes Sv	85	15	45	65	71	29	71	29	2	98
Mortes RGV	88	12	99	1	59	41	42	58	48	52

Ouverture: Comment la présence de CpGV-R5 aide à la réplication de CpGV-M?

Auteurs

Benoît GRAILLOT
Christine BLACHERE-LOPEZ
Miguel LOPEZ-FERBER

Partenaires



instituto de agrobiotecnología
agrobioteknologiako institutua

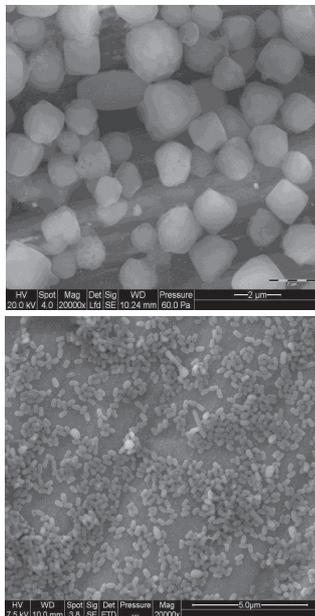


La protection des cultures, cause de pollution diffuse

- Sans protection des cultures, les récoltes seraient lourdement compromises, et la survie de notre agriculture difficile à assurer.
- La protection des vergers de pommes demande jusqu'à 25 traitements annuels pour éviter les attaques d'insectes ravageurs.
- L'arrivée d'un nouveau ravageur peut détruire complètement la production.
- Les insecticides chimiques se retrouvent dans les sols, puis dans l'eau, où ils ont des effets nocifs.



Dégâts produits par les larves de *T. solanivora* : formation de galeries et pourrissement à cause de l'infection secondaire par des micro-organismes.
Photos : C. Espinel ; P. Cuartas.



Les deux structures de résistance des baculovirus: le polyèdre et le granule.
Photos M. Lopez-Ferber et J.M. Taulemesse

L'utilisation de pathogènes des ravageurs comme alternative

- Éliminer les ravageurs en les rendant malades.
- Mais en n'affectant pas le reste de l'écosystème (plantes, animaux, micro-organismes)

Les baculovirus, insecticides biologiques de choix

- Famille de virus inféodée aux arthropodes. Sans pathogénicité pour les plantes ni les animaux.
- Chaque espèce de virus se réplique sur une ou quelques espèces d'insecte proches.
- Les baculovirus survivent dans l'environnement.
- Mais des améliorations possibles :
 - Meilleure efficacité sur un (nouveau) hôte
 - Contrôle du développement de résistances

Sélectionner des baculovirus pour une meilleure efficacité

Variabilité naturelle

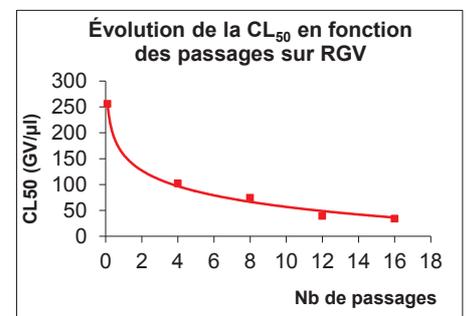
- Prospection et collecte de nouveaux isolats viraux.
- Caractérisation de leur potentiel.

Adaptation dans le laboratoire

- Amélioration de performances envers un hôte.
- Adaptation à un nouvel hôte proche (pas toujours possible).

Maintenir l'efficacité au cours du temps

- Contrôle de l'apparition de résistances chez l'hôte.
- Maintien de la diversité génétique.



Diminution de la dose nécessaire pour contrôler un insecte au cours des générations de sélection d'un baculovirus.
Données M. Berlinget C. Blachère-Lopez

NNT : 2015 EMSE 0782

Benoît GRAILLOT

Analysis of the sustainability of biological control using baculovirus in orchards protection conditions.

Speciality : Science and environmental engineering

Keywords : *Cydia pomonella*, *Cydia molesta*, biological control, baculovirus, CpGV, resistance, viral evolution, genetic diversity

Abstract :

Resistance to biocontrol agents is a critical issue worldwide in orchards. Thereby the codling moth *Cydia pomonella* developed resistances under repeated treatments with *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) in several European countries. These resistances raise the issue of the durability of such a pest control. This work aims to investigate various aspects of granulovirus/host interactions: first by studying the susceptibility variations to CpGV infection between different laboratory insect colonies in order to assess the mechanisms of resistances apparition; to investigate the virus diversity, complete genomes of five viral isolates used over this work have been sequenced and an analysis of the positively selected genes has been carried out as to come up with new genes potentially important for the fitness of the virus. The adaptability of CpGV to a resistant *C. pomonella* host as well as to a related specie, *Cydia molesta* has also been studied. Finally, the efficiency, on different insect colonies, of mixed populations of viral genotypes as well as their successive offspring have been analyzed. These studies allowed highlighting a wide genetic diversity among CpGVs, together with co-infection within cell and recombination phenomenon. Thus, if it seems impossible to certify a biocontrol method with constant efficacy, it appears that the evolutive capacities of viruses will allow overcoming host resistance phenomenon. However, one will need to keep one step ahead from the virus, which means an annual survey to permit a directed evolution of the virus.

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

NNT : 2015 EMSE 0782

Benoît GRAILLOT

Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de baculovirus dans les conditions de protection des cultures fruitières

Spécialité: Sciences et Génie de l'Environnement

Mots clefs : *Cydia pomonella*, *Cydia molesta*, contrôle biologique, baculovirus, CpGV, résistance, évolution virale, diversité génétique

Résumé :

La résistance aux agents de biocontrôle est un problème majeur dans les cultures du monde entier. Ainsi, le carpocapse du pommier, *Cydia pomonella*, a développé des résistances contre des traitements répétés au *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) dans plusieurs pays d'Europe. Ces résistances posent la question de la durabilité de ce type de lutte contre les ravageurs. Ce travail porte sur l'étude de plusieurs aspects des interactions granulovirus/hôtes : en premier lieu, sur l'étude des différences de sensibilité au CpGV entre des colonies d'insectes de laboratoire afin de mieux cerner les mécanismes d'apparition de résistances. Concernant le virus, le génome complet de cinq isolats viraux utilisés au cours de ces travaux a été séquencé et une analyse des gènes positivement sélectionnés a été conduite afin de découvrir de nouveaux gènes potentiellement importants pour la valeur sélective du virus. L'adaptabilité du CpGV à un hôte *C. pomonella* résistant ainsi qu'à un hôte d'une espèce proche, *Cydia molesta* a également été étudiée. Enfin, l'efficacité, sur différentes colonies d'insectes, de populations de génotypes viraux mélangées ainsi que de leurs générations successives ont été analysés. Ces études nous ont permis de mettre en évidence une diversité génétique très étendue chez le CpGV ainsi que des phénomènes de co-infections d'une même cellule et de recombinaison. Ainsi, s'il semble impossible de certifier une méthode de biocontrôle d'une efficacité constante, il apparaît que les capacités évolutives des virus permettront de supporter des phénomènes de résistance des hôtes. Il faudra cependant toujours conserver une longueur d'avance sur le virus et cela passera par un suivi annuel afin de permettre une évolution dirigée du virus.