



Structuration des populations virales chez les baculovirus. Importance de l'infection multiple.

Aurélie Hinsberger

► To cite this version:

Aurélie Hinsberger. Structuration des populations virales chez les baculovirus. Importance de l'infection multiple.. Sciences agricoles. IMT - MINES ALES - IMT - Mines Alès Ecole Mines - Télécom, 2020. Français. NNT: 2020EMAL0005 . tel-03124440

HAL Id: tel-03124440

<https://theses.hal.science/tel-03124440>

Submitted on 28 Jan 2021

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.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES MINES
D'ALÈS (IMT MINES ALÈS)**

**En Biochimie et biologie moléculaire
École doctorale [GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation,
Environnement, Terre, Eau]
Portée par l'Université de Montpellier**

**Unité de recherche LGEI (Laboratoire de Génie de l'Environnement
Industriel)**

**Structuration des populations virales chez les
baculovirus.
Importance de l'infection multiple.**

Présentée par Aurélie Hinsberger

Soutenue à Alès, le 04 novembre 2020

Devant le jury composé de

**Miguel Lopez-Ferber, Pr. IMT Mines Alès
Franck Gallardo, PhD Neovirtech, Toulouse**

**Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse**

**Christian Siatka, Pr. Associé, Directeur de l'École de l'ADN, Nîmes
Primitivo Caballero, Pr. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Espagne
Nathalie Volkoff, DR INRAE, Montpellier
Marie Berling, PhD CREA, Bonneville
Myriam Siegwart, IE INRAE, Avignon**

**Rapporteur
Rapporteur
Présidente du jury
Examinatrice
Invitée**

REMERCIEMENTS

Je commencerai mes remerciements par une citation qui illustre ma propre expérience :

« L'expérience est une bougie qui n'éclaire que celui qui la porte »

Confucius

En dépit des obstacles rencontrés au cours de cette thèse, je renouvellerais cette expérience sans hésiter, surtout grâce aux personnes rencontrées qui m'ont permis de surmonter chacun d'entre eux.

Je remercie les agriculteurs M. Jean Pierre Lacanal et M. Crestin. Ils m'ont permis d'accéder à leurs pommeraies donnant ainsi une dimension pratique plus amusante à ce projet.

Merci également aux membres du jury, Mme Marie Berling, M. Primitivo Caballero, M. Christian Siatka et Mme Nathalie Volkoff pour leur mobilisation qui a permis la tenue de ma soutenance malgré la crise 2020. Et bien sûr Myriam Siegwart et Franck Gallardo avec qui j'ai aussi eu le plaisir de travailler au cours de ces trois ans. Merci aussi à Annie Bezier qui m'a soutenue et bien fait rire au congrès de Valencia.

J'adresse aussi un bisou tout particulier (voir deux s'ils sont suffisamment sages) à Stéphane Theulier et à Patrice Guerrero !

Merci à l'ensemble des personnes présentes au LGEI, surtout Sandrine Bayle, alias Dieu, je ne peux que te souhaiter une bonne année !!! Noémie Flayol, merci pour ces petits moments au labo et au bar avant 2020.

Je tiens à remercier Miguel Lopez-Ferber, tu m'as encadrée tout au long de cette thèse et tu as répondu avec calme et patience aux questions dont je t'ai accablé... pour ta gentillesse et ta disponibilité et aussi pour nous avoir fait découvrir ta région d'enfance, les Asturies, le cidre,... et évidemment pour les souvenirs en trottinette !

À Christine Blachère Lopez, merci pour tous ces moments, pour ton enseignement au labo en musique, pour ton côté pratique qui me sera sûrement le plus utile dans la vie, pour ton soutien dans mon apprentissage de langue, Leviosaaaaa... pour ta culture G de topito et Giant microbe et pour tout simplement ta bonne humeur qui représente la part essentielle de la vie du P2 (au moins 50%).

Merci à Romain Durello et David Feith, heureusement que vous êtes là les padawans !!!!

Merci aux 2 Savary Michael et Émeline, qui nous ont intégrés à notre arrivée à Alès, Aliénor Dutheil de la Rochère pour nos petits moments de partage. À d'autres amis dont on ne peut pas se passer puisqu'on les connaît depuis des années, Alexandre Soriano ou Laura Verrecchia. Et à d'autres

qu'on ne côtoie que quelques mois comme Isabel Belda. Et parce que sans vous rien n'aurait été pareil, merci à mes 4 beaufs préférés : Nicolas Akil, Valentin Ledoux, Delphine Le Maut et Dylan Feith.

Merci à la super famille Hinsberger, dont le mélange des genres fait sa force, pour m'avoir soutenue toute ces années, alors que franchement je n'y croyais pas moi-même.

Évidemment le dernier mais pas des moindres, merci à toi Dylan. Merci de me supporter et m'avoir tenue les cheveux les veilles de soutenance. Merci d'avoir accepté de partager ma vie, de me soutenir et de rester ouvert à mes extravagances. Je vais profiter de l'occasion pour te dire tout simplement : Je t'aime.

Merci à l'ensemble des personnes qui ont permis à cette thèse d'aboutir. Merci à tous et à toutes !

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION..... 1

I. Ravageurs des cultures et des denrées : méthodes de protection 1

I.1. Vision de la lutte biologique avant le XVIII^{ème} siècle..... 1

I.2. Lutte biologique moderne 4

II. Baculovirus..... 7

I.3. Classification et structure..... 7

I.4. Cycle d'infection..... 9

I.5. Principaux gènes et protéines viraux..... 12

I.6. Populations naturelles de baculovirus 14

I.7. Apparition de résistances spécifiques : une fatalité ?..... 19

*II. Lutte biologique contre *Cydia pomonella* 25*

II.1. Ravageur *Cydia pomonella* 25

II.2. Moyens de lutte existants contre *Cydia pomonella*..... 27

II.3. CpGV vs *Cydia pomonella* 27

III. Nouvelle ère de biopesticides : pourquoi et comment prendre avantage de l'infection multiple 29

III.1. Co-enveloppement 30

III.2. Infection multiple : interaction neutre, compétitive ou bénéfique ? Le cas d'étude de PhopGV 31

III.3. Contournement de la résistance : Le cas d'étude de CpGV 31

III.4. Infections multiples virales, la stratégie des populations naturelles : Le cas d'étude de SfMNPV 32

III.5. Infections multiples inter-espèces entre virus entomopathogènes 33

III.6. Vers un nouveau paradigme dans les bioinsecticides à base de baculovirus 34

IV. Quels sont les verrous scientifiques à l'étude des infections multiples chez les baculovirus ?.. 35

IV.1. Observation directe du virus par microscopie..... 35

IV.2.	Détections des composants du virus	36
IV.3.	Marquage de la cellule infectée	36
IV.4.	État de l’art des outils utilisés pour la détection des génotypes de CpGV	36
V.	<i>Objectifs de recherche</i>	37
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES		39
I.	<i>Matériels</i>	39
V.1.	Colonie de <i>Cydia pomonella</i> sensible au virus CpGV-M : CpNPP	39
V.2.	Colonie de <i>Cydia pomonella</i> résistante au virus CpGV-M : R _{GV}	39
V.3.	Population de <i>Spodoptera exigua</i>	39
V.4.	Cellules	40
V.5.	Isolats viraux	40
VI.	<i>Méthodes</i>	40
VI.1.	Élevages de <i>Cydia pomonella</i> et <i>Spodoptera exigua</i>	40
VI.2.	Cultures cellulaires.....	41
VI.3.	Amplifications virales et production de stocks viraux	41
VI.4.	Différentes catégories d’infection	42
VI.5.	PCR, qPCR et HRM	44
VI.6.	Microscopie.....	46
CHAPITRE 3 : TRAÇAGE D’INFECTIONS PAR BACULOVIRUS À L'AIDE DE LA TECHNOLOGIE ANCHORTM		49
I.	<i>Introduction</i>	49
II.	<i>Technologie ANCHORTM</i>	50
III.	<i>Application de la technologie aux baculovirus : Preuve de concept AcMNPV-ANCHOR</i>	51
III.1.	Synthèse de AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1	51
III.2.	Caractéristiques biologiques et structurales du virus recombinant AcMNPV-ANCHOR3	53
III.3.	Suivi de l’infection en temps réel	56
III.4.	Quantification des BV par fluorimètre.....	57

III.5.	Infection avec un mélange AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1.....	58
IV.	<i>Application de la technologie : CpGV-M-ANCHOR3 et CpGV-R5-ANCHOR1</i>	59
IV.1.	Absence de modèle cellulaire	59
IV.2.	Synthèse des virus recombinants CpGV-M-ANCHOR3 et CpGV-R5-ANCHOR1.....	60
IV.3.	Méthodes de sélection des CpGV-ANCHOR recombinants	62
V.	<i>Discussion et conclusion</i>	64
 CHAPITRE 4 : DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES GÉNOTYPES DE CpGV IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE DE TYPE I PAR qPCR ET HRM		
67		
I.	<i>Introduction</i>	67
II.	<i>Développement de la méthode HRM</i>	70
II.1.	Mélanges viraux et établissement d'une gamme standard.....	70
II.2.	Infections virales de CpNPP avec des mélanges et extraction des néo-BV	71
II.3.	Infections virales de CpNPP avec des mélanges de génotypes et analyse des OB produits.....	71
II.4.	qPCR et HRM.....	72
III.	<i>Résultats</i>	72
III.1.	Identification et quantification des génotypes dans un mélange.....	72
III.2.	Analyse des BV extraits de l'hémolymph	77
III.3.	Analyse des productions d'OB	81
IV.	<i>Discussion et conclusion</i>	83
 CHAPITRE 5 : COMPARAISON DE LA DISPERSION ET DE L'OCCURRENCE DE CpGV ENTRE LABORATOIRE ET CONDITIONS NATURELLES.....		
85		
I.	<i>Introduction</i>	85
II.	<i>Distribution des probabilités d'infection</i>	87
III.	<i>Simulation d'infection due au CpGV en conditions de laboratoire</i>	89

<i>IV.</i>	<i>Conditions naturelles</i>	<i>92</i>
IV.1.	Terrain d'étude.....	92
IV.2.	Comparaison entre les deux méthodes de dispersion du CpGV utilisées dans les vergers.....	94
IV.3.	Test d'infection avec des feuilles du verger.....	95
<i>V.</i>	<i>Discussion et Conclusion</i>	<i>97</i>
CHAPITRE 6 : CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS L'INFECTION MULTIPLE		101
<i>I.</i>	<i>Introduction.....</i>	<i>101</i>
<i>II.</i>	<i>Mécanismes des infections multiples : étape d'ingestion du virus.....</i>	<i>102</i>
II.1.	Importance de l'ordre d'ingestion.....	102
II.2.	Délai entre l'ingestion des différents génotypes	103
<i>III.</i>	<i>Effet « helper » pour CpGV-M en coinfection, générique ou spécifique ?</i>	<i>104</i>
<i>IV.</i>	<i>Discussion et conclusion</i>	<i>106</i>
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET.....		109
PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....		109

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Chapitre 1

Figure 1	Invasion de criquets pèlerins.....	1
Figure 2	Aménagement des espaces de stockage des denrées alimentaires.....	2
Figure 3	Introduction de prédateurs.....	2
Figure 4	Arbre phylogénétique des baculovirus.....	7
Figure 5	Structures des différents baculovirus : NPV et GV.....	8
Figure 6	Les différents morphotypes des baculovirus retrouvés au cours du cycle d'infection	9
Figure 7	Cycle d'infection des baculovirus.....	12
Figure 8	Les différentes échelles de diversité possibles retrouvées au sein des NPV.....	15
Figure 9	Cas d'encapsidations multiples recensés chez les espèces : CpGV, ObGV et EpapGV.....	17
Figure 10	Nombre cumulé d'espèces d'insectes résistantes aux insecticides de 1920 à 2010	20
Figure 11	Modes d'action des insecticides agissant sur le système nerveux de l'insecte.....	21
Figure 12	Photographies de <i>Cydia pomonella</i>	25
Figure 13	Répartition géographique de <i>Cydia pomonella</i> dans le monde.....	25
Figure 14	Cycle de vie de <i>Cydia pomonella</i>	26
Figure 15	Photographie par MEBE de CpGV et photographie de <i>Cydia pomonella</i>	27
Figure 16	Infection primaire chez les baculovirus.....	30

Chapitre 2

Figure 17	<i>Spodoptera exigua</i> adulte.....	39
Figure 18	Élevage de <i>Cydia pomonella</i>	41
Figure 19	Thermocycleur utilisé dans les différents projets de recherche.....	46

Chapitre 3

Figure 20	Fonctionnement d'un baculovirus modifié ANCHOR3™.....	51
Figure 21	Construction des plasmides pUC19-AcMNPV-ANCHOR3 et pUC19-AcMNPV-ANCHOR1.....	52
Figure 22	Construction des virus AcMNPV-ANCHOR.....	53
Figure 23	Morphotypes de AcMNPV-ANCHOR3 visualisés par MEB et MET.....	54

Figure 24	Visualisation par microscopie à fluorescence d'une infection par AcMNPV-ANCHOR3 de l'intestin moyen.....	55
Figure 25	Titres viraux des baculovirus AcMNPV-Wt et AcMNPV-ANCHOR3 au cours d'une cinétique d'infection.....	55
Figure 26	Événements d'infection des cellules <i>Sf9</i> par AcMNPV-ANCHOR3.....	56
Figure 27	Cinétique d'infection de cellules <i>Sf9</i> par AcMNPV-ANCHOR3.....	57
Figure 28	Fluorimétrie des infections cellulaires par AcMNPV-ANCHOR3.....	58
Figure 29	Cellules <i>Sf9</i> infectées par un mélange AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1.....	58
Figure 30	Cellules <i>Sf9</i> infectées coinfectées par AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1.....	59
Figure 31	Construction des plasmides CpGV-ANCHOR.....	61
Figure 32	Larves dans lesquelles le mélange de transfection a été injecté.....	62
Figure 33	Tissus de larves infectées par CpGV-ANCHOR.....	63
Figure 34	Électrophorèse des produits PCR des amplifications individuelles.....	64

Chapitre 4

Figure 35	Principe de la qPCR.....	68
Figure 36	Fragments de la séquence protéine du gène <i>pe38</i> des différents isolats CpGV...	69
Figure 37	Principe de la HRM.....	70
Figure 38	Courbe d'amplification PCR de la gamme standard.....	73
Figure 39	Courbes de fusion des amplicons de la gamme standard.....	74
Figure 40	Courbe de fusion normalisée et clusterisation de la gamme standard.....	76
Figure 41	Courbes de fusion des amplicons des BV obtenus sur des larves dans des conditions d'infection mixte.....	77
Figure 42	Courbes de fusion des BV normalisées et clusterisées par rapport à la gamme standard.....	79
Figure 43	Courbes de fusion des amplicons des OB obtenus sur des larves dans des conditions d'infection mixte.....	81
Figure 44	Courbes de fusion des OB normalisées et clusterisées par rapport à la gamme standard.....	82

Chapitre 5

Figure 45	Composition virale des produits commerciaux Madex [®] Max et Carpovirusine [®] Evo2.....	86
------------------	--	----

Figure 46	Feuilles de pommier mordues en surface par une larve observées par MEBE....	88
Figure 47	Probabilité théorique pour une larve de manger au moins 1 OB de CpGV-M et CpGV-R5 en conditions agronomiques.....	89
Figure 48	Système de dispersion virale par nébulisation.....	90
Figure 49	Génotypes CpGV trouvés 72 hp.i. chez des néonates CpNPP infectées dans des conditions de laboratoire sur des feuilles infestées artificiellement.....	91
Figure 50	Génotypes CpGV trouvés 72 hp.i. chez des néonates R _{GV} infectées dans des conditions de laboratoire sur des feuilles infestées artificiellement.....	92
Figure 51	Terrain d'étude de deux pomiculteurs.....	93
Figure 52	Système de dispersion à petit volume (300 L.ha ⁻¹).....	93
Figure 53	Insectes présents dans les pommes piquées.....	94
Figure 54	Dispersion des biopesticides viraux sur feuilles de verger observée par MEBE..	95
Figure 55	Génotypes CpGV retrouvés 72 hp.i. dans des larves CpNPP infectées sur des feuilles infestées en verger avec Carpovirusine [®] Evo2.....	96
Figure 56	Génotypes CpGV retrouvés 72 hp.i. dans des larves R _{GV} infectées sur des feuilles infestées en verger avec Carpovirusine [®] Evo2.....	97

Chapitre 6

Figure 57	Protocole de l'expérience ordre d'infection.....	102
Figure 58	Statut d'infection de larves R _{GV} inoculées avec les deux virus dans les deux ordres.....	103
Figure 59 :	Protocole de l'expérience du délai d'ingestion.....	103
Figure 60	Pourcentage de larves R _{GV} infectées en fonction de différents temps de latence entre l'exposition aux différents génotypes.....	104
Figure 61	Ravageurs : <i>Cydia pomonella</i> , <i>Cryptophlebia peltastica</i> , <i>Thaumatotibia leucotreta</i>	105
Figure 62	Courbes de fusion des amplicons de la double inoculation CrpeNPV et CpGV sur CpNPP.....	106

Tableaux :

Tableau 1	Liste des découvertes de virus entomopathogènes.....	6
Tableau 2	Résistances d'arthropodes spécifiques aux baculovirus.....	23
Tableau 3	Groupes génétiques de CpGV des différents produits commerciaux et isolats auxquels ils correspondent.....	29

Tableau 4	Mélanges CpGV-M et CpGV-R5 utilisés comme gamme standard et comme inoculum.....	43
Tableau 5	Mix PCR, qPCR et HRM utilisés dans les différents projets.....	44
Tableau 6	Amorces utilisées au cours de chaque projet de recherche.....	45
Tableau 7	Titres viraux obtenus par titration en plaques entre les différents passages (Ai) de AcMNPV-Wt et AcMNPV-ANCHOR.....	56
Tableau 8	Mélanges réactionnels et cycles de qPCR.....	63
Tableau 9	Mélanges CpGV-M et CpGV-R5 utilisés comme gamme standard et comme inoculum.....	71
Tableau 10	Mélanges réactionnels et cycles de qPCR et HRM.....	72
Tableau 11	Nombre et taille des morsures de <i>Cydia pomonella</i> au cours du temps.....	87

Équation :

Équation 1	Équation 1 : Formule utilisée pour déterminer la concentration du CpGV (OB.µL ⁻¹) par densité optique (DO)	42
-------------------	--	----

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles :

- Article 1 Hinsberger A.; Theulier Saint Germain S.; Guerrero P.; Blachère-López C.; López-Ferber M.; Bayle S. *A Combination of Real-Time PCR and High-Resolution Melting Analysis to Detect and Identify CpGV Genotypes Involved in Type I Resistance*. Viruses 2019, 11(8), 723.
- Article 2 Hinsberger A., Graillot B., Blachère-Lopez C., Juliant S., Cerutti M., King L. A., Possee R., Gallardo F., Ferber, M. L. *Tracing baculovirus AcMNPV infection using a real-time method based on ANCHORTM DNA labeling technology*. Viruses, 2020, 12(1). 50.
- Article 3 Hinsberger, A.; Blachère-Lopez, C.; Lopez-Ferber, M. *Promoting mixed genotype infections in CpGV: analysis on field and laboratory sprayed apple leaves*. Biocontrol Sci. Technol. 2020, 1–8.
- Article 4 Siegwart, M.; Maugin, S.; Besse, S.; Lopez-Ferber, M.; Hinsberger, A.; Gauffre, B. *Le carpocapse des pommes résiste au virus de la granulose*. Phytoma. 2020. 45-50.

Présentations orales :

- Présentation 1 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2018). Why codling moth became resistant to industrial CpGV-M based insecticides and not to natural virus populations? Workshop Experimental approaches to test for coévolution. Gif sur Yvette (France).
- Présentation 2 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2018). Préserver la diversité pour une lutte biologique efficace. Journée pour la lutte contre le carpocapse. Avignon (France).
- Présentation 3 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez, C. (2019). Insecticides - Gestion de la résistance au virus de la granulose chez le carpocapse des pommes. Journées d'Échanges sur les Résistances aux produits de protection des plantes (JER). Versailles (France).
- Présentation 4 Hinsberger A., Blachère-Lopez C. Graillot B., Juliant S., Cerutti M., King L., Possee R., Gallardo F., Lopez-Ferber, M. (2019). Tracing AcMNPV infection using a real time method based on ANCHOR DNA labeling technology. Colloque SIP-IOBC. Valencia (Espagne).

- Présentation 5 Hinsberger A., Theulier Saint Germain S., Guerrero P., Lopez-Ferber, M., Blachère-Lopez C. Bayle S. (2019). HRM analysis based diagnosis method for the detection of the genotype involved in type I resistance to CpGV. Colloque SIP-IOBC. Valencia (Espagne).
- Présentation 6 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2019). Ma thèse en 180 secondes. Journée de la recherche. Alès (France).
- Présentation 7 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2019). Préserver la diversité pour une lutte biologique efficace. Journée pour la lutte contre le carpocapse. Avignon (France).

Posters :

- Poster 1 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2018). Poster : Why codling moth became resistant to industrial CpGV-M based insecticides and not to natural virus populations? Workshop experimental approaches to test for coevolution. Gif sur Yvette (France).
- Poster 2 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2019). Poster : Survey of CpGV distribution in treated orchards. Colloque IOBC-SIP. Valencia (France).
- Poster 3 Hinsberger A., Lopez-Ferber M., Blachère-Lopez C. (2019). Poster : Structuration des populations virales chez les baculovirus. Importance de l'infection multiple. Journée de la recherche. Alès (France).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ADNsb	ADN simple brin
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
BV	<i>Budded virus</i>
CATH	<i>Cathepsin</i>
<i>chiA</i>	Chitinase
Cq	Cycle de quantification
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DL50	Dose létale pour 50 % de la population
DO	Densité optique
<i>egt</i>	Ecdysteroid glucosyltransferase
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno assay</i>
FAOSTAT	<i>Food and agriculture organization of the united nations</i>
GABA	γ -amino-butyric acid
GFP	Green fluorescence protein
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GV	Granulovirus
ha	Hectare
hp.i.	Heures post infection
IAP	<i>Inhibitors of apoptosis</i>
ICTV	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
IRAC	<i>Insecticide resistance action committee</i>
IRM	<i>Insecticide resistance management</i>
jp.i.	Jours post infection
kbp	Kilo base pair
LEF	<i>Late expression factor</i>
LET50	<i>Lethal exposure time</i> : temps d'exposition pour tuer 50% de la population
MEBE	Microscopie/microscope électronique à balayage environnemental
MET	Microscope électronique à transmission
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MP	Membrane péritrophique
n.d.	Non défini
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
Network R4P	Réseau de réflexion et de recherches sur les résistances aux pesticides
NTC	<i>No template control</i>
OB	<i>Occlusion bodies</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potentiel hydrogène
PIF	<i>per os infectivity factor</i>
PTA	Acide phosphotungstique
QSP	Quantité suffisante pour
REN	<i>Restriction endonuclease</i>
RFP	<i>Red fluorescence protein</i>
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rpm	<i>Rotation per minute</i>
SCR-C	<i>Scavenger receptor class C</i>

siARN	<i>Small interfering RNA</i> (Petit ARN interférent)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TARBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
Tf _m	Température de fusion moyenne
T _m	Température de fusion des amorces
ubi	Ubiquitine
VEF	<i>Viral enhancing factor</i>
vfgf	<i>Viral fibroblast growth factor</i>
VSR	<i>Viral suppressors of RNA silencing</i>
WHO	<i>World health organization</i>
y-int	y-intercept
Σ	Écart type

Espèces d'insectes ou de virus

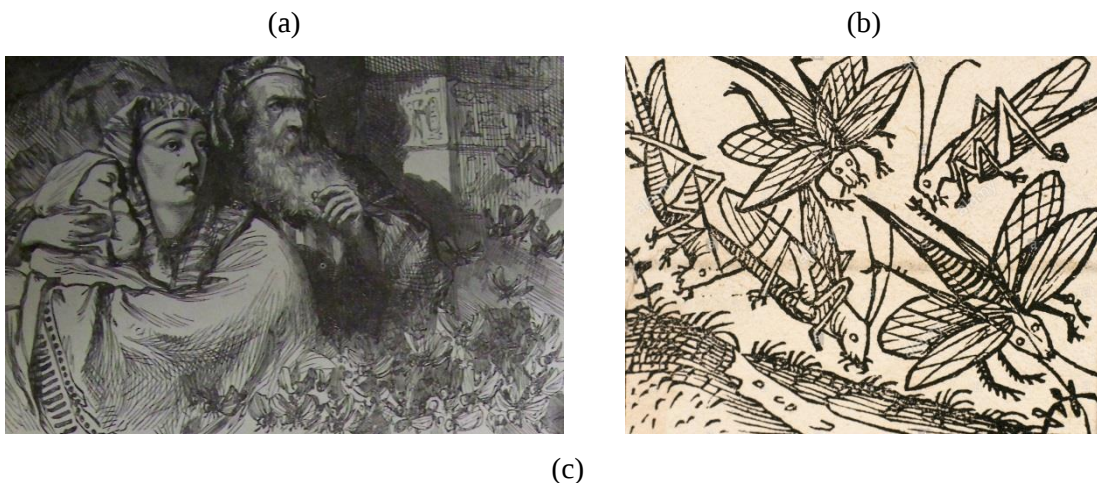
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucléopolyédrovirus</i>
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatilis multiple nucléopolyédrovirus</i>
BmMNPV	<i>Bombyx mori multiple nucléopolyédrovirus</i>
ChinNPV	<i>Chrysodeixis includens nucléopolyédrovirus</i>
Cp	<i>Cydia pomonella</i>
CpGV	<i>Cydia pomonella granulovirus</i>
CrpeNPV	<i>Cryptophlebia peltastica nucléopolyédrovirus</i>
EpapGV	<i>Epinotia aporema granulovirus</i>
GV	<i>Granulovirus</i>
HearNPV	<i>Helicoverpa armigera nucléopolyédrovirus</i>
HzMNPV	<i>Heliothis zea multiple nucléopolyédrovirus</i>
LaolNPV	<i>Lacanobiaoleracea nucléopolyédrovirus</i>
LdMNPV	<i>Lymantria dispar multiple nucléopolyédrovirus</i>
MabrNPV	<i>Mamestra brassicae nucléopolyédrovirus</i>
MadiNPV	<i>Malacosoma disstria nucléopolyédrovirus</i>
MaviNPV	<i>Maruca vitrata multiple nucléopolyédrovirus</i>
McpNPV	<i>Malacosoma californicum pluviale nucléopolyédrovirus</i>
MNPV	<i>Multiple nucléopolyédrovirus</i>
OpbuNPV	<i>Operophtera brumata nucléopolyédrovirus</i>
PaflNPV	<i>Panolis flammea nucléopolyédrovirus</i>
PbGV	<i>Pieris brassicae granulovirus</i>
PhopGV	<i>Phthorimaea operculella granulovirus</i>
PiGV	<i>Plodia interpunctella granulovirus</i>
PsinSNPV	<i>Pseudoplusia includens single nucléopolyédrovirus</i>
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua multiple nucléopolyédrovirus</i>
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda multiple nucléopolyédrovirus</i>
SNPV	<i>Single nucléopolyédrovirus</i>
SpexNPV	<i>Spodoptera exempta nucléopolyédrovirus</i>
SpltNPV	<i>Spodoptera litura nucléopolyédrovirus</i>
SpltNPV	<i>Spodoptera litura nucléopolyédrovirus</i>
TnSNPV	<i>Trichoplusia ni single nucléopolyédrovirus</i>

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I. RAVAGEURS DES CULTURES ET DES DENRÉES : MÉTHODES DE PROTECTION

I.1. Vision de la lutte biologique avant le XVIII^{ème} siècle

À partir du Néolithique (10 000 à 8000 ans avant J.-C.), les sociétés humaines ont connu des transformations majeures liées au développement de l'agriculture [1] qui a entraîné la sédentarisation des populations. Pour répondre à une population grandissante et au besoin de la nourrir, l'agriculture est devenue de plus en plus intensive ; entraînant la concentration des cultures et leurs menaces par des phytopathogènes, mauvaises herbes et ravageurs. Ces derniers sont responsables à eux seuls d'environ 1/3 des pertes de la production agricole dans le monde [2], pouvant localement détruire la totalité des récoltes entraînant des famines. Par exemple, dans le livre de l'Exode, la 8^{ème} plaie d'Égypte relate des invasions de criquets pèlerins (*Schistocerca gregaria*) (Figure 1). Ces invasions sont encore d'actualité.



« [...] ELLES COUVRIRENT LA SURFACE DE TOUTE LA TERRE, ET LA TERRE FUT DANS L'OBSCURITÉ ; ELLES DÉVORÈRENT TOUTE L'HERBE DE LA TERRE ET TOUT LE FRUIT DES ARBRES, TOUT CE QUE LA GRÊLE AVAIT LAISSÉ ; ET IL NE RESTA AUCUNE VERDURE AUX ARBRES NI À L'HERBE DES CHAMPS, DANS TOUT LE PAYS D'ÉGYPTE. [...] »

Figure 1 : Invasion de criquets pèlerins (a) Les sauterelles, la 8^{ème} plaie d'Égypte, extrait de la Bible Holman, 1890 (b) gravure du XVI^{ème} extraite de l'ancien testament (c) Extrait de l'Exode 10,13-14,19.

Pour protéger les cultures et les récoltes, divers moyens de lutte ont été développés à travers le monde et les époques. Parmi eux, se trouvent ceux dits préventifs, avec l'aménagement des espaces de stockage pour préserver les denrées : au Néolithique, les celtes avaient aménagé des silos souterrains (Figure 2a) ; au I^{er} siècle avant J.C., l'empire Romain avait aménagé des greniers en hauteur pour protéger les récoltes de céréales des rongeurs (Varron , *De Agricultura*, livre I). Ces greniers galiciens sur pilotis, ou « *Hórreos* », sont encore utilisés dans le nord-ouest de l'Espagne (Figure 2b).



Figure 2 : Aménagement des espaces de stockage des denrées alimentaires (a) Silos de l'oppidum d'Ensérune (Hérault) [3] (b) Hórreos [4].

Les recherches archéologiques ont permis de mettre en évidence l'existence d'autres méthodes de lutte notamment l'introduction de prédateurs de ces ravageurs. Les premières traces remontent à l'Égypte antique, 4000 ans avant J.C., avec la domestication du chat pour protéger les champs (de blé et d'orge) des rongeurs et des oiseaux. (Figure 3a) [5]. En l'an 304, en Chine, pour la défense des agrumes contre divers insectes, on retrouve aussi l'introduction de fourmis *Oecophylla smaragdina* [6] (Figure 3b). En 1762, dans les îles Maurice, des martins tristes (*Myna commun*) ont été introduits pour chasser le scinque de Macchabé (*Gongylomorphus fontenayi*) [7] (Figure 3c). En 1877, la mangouste indienne a été utilisée à Porto Rico pour limiter la prolifération des rats [8] (Figure 3d).



Figure 3 : Introduction de prédateurs (a) Peintures murales de la tombe de Nébamon, Scène de chasse dans les marais avec un chat (Thèbes) [9] (b) *Oecophylla smaragdina* [10] (c) Martin triste [7] (d) Mangouste indienne [11].

Une autre méthode pour lutter contre ces ravageurs consiste à utiliser des pesticides. L'étymologie du mot pesticide provient de « *pestis* » qui signifie « fléau » et de « -cide » qui en latin « *caedere* » signifie « frapper, tuer ». Ils sont utilisés pour l'élimination ou la neutralisation des nuisibles dans les secteurs agricoles (produits phytopharmaceutiques) et non agricoles (biocides) [12]. On peut les classifier selon leurs activités, ainsi les fongicides tuent les champignons, les herbicides tuent les « mauvaises herbes » et les insecticides tuent les insectes.

Les premières utilisations de pesticides remontent à l'antiquité ; parmi elles, au I^{er} siècle, l'utilisation par les romains de minéraux à base d'arsenic (décrit par Pline l'Ancien).

D'autres pesticides d'origines naturelles, c'est à dire extraits de végétaux (produits par les plantes pour se défendre) ont été utilisés, tels que le marc d'olives pressurées au V^{ème} siècle pour éloigner des nuisibles comme les fourmis ou les rats (Palladius, *De Re Rustica*). En Europe médiévale, l'aconit (herbacées, de la famille des *Ranunculaceae*) était utilisée comme répulsif contre les rongeurs [13]. Au XII^{ème} siècle, les effets toxiques des plantes ont commencé à attirer l'attention. Maïmonide, médecin du XII^{ème} siècle, les a répertoriés dans son ouvrage médical, *Le traité des poisons* [14]. Au XVI^{ème} siècle, l'encyclopédie d'agriculture *Geoponika*, regroupe un grand nombre de plantes et leurs propriétés [15]. S'ensuit au cours de ce siècle l'application d'insecticides végétaux comme l'huile de neem, extraite des graines du margousier (*Azadirachta indica*) [16], le camphre, extrait du camphrier (*Cinnamomum camphora*) et la roténone, extraite des racines de diverses plantes tropicales (dont *Paraderris elliptica*) [17]. À cette même période, l'utilisation de l'arsenic et du plomb comme insecticide se développe en Chine et en Europe [16]. Les propriétés insecticides de la nicotine, extraite à partir du tabac (*Nicotiana tabacum*), sont découvertes au XVII^{ème} [12].

À partir de 1734, Réaumur, un entomologiste qui travaille sur les parasites des insectes, propose dans sa collection d'ouvrages intitulée « Mémoire pour servir à l'histoire des insectes », d'utiliser leurs parasites en lutte biologique [18]. En parallèle, la chimie minérale connaît un essor, notamment grâce aux sels de cuivre.

Les techniques de lutte contre les ravageurs étaient jusque-là très empiriques. Au XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècle, l'agriculture connaît une révolution majeure déclenchée par la révolution industrielle. Elle se traduit par un passage d'une polyculture principalement vivrière à une monoculture de masse. Les moyens de lutte ont suivi la même tendance, l'industrialisation des systèmes de production a permis un essor des pesticides. Comme les produits chimiques de synthèse sont peu coûteux, ils vont supplanter les pesticides naturels à partir des années 40 ; et principalement le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) synthétisé par Othmar Zeidler en 1874. Muller a breveté en 1940 son activité contre les arthropodes (insectes, acariens) [19]. Le DDT est rapidement devenu l'un des pesticides les plus utilisés.

La publication en 1972 du « Printemps silencieux » [20] met en lumière les critiques déjà émises par certains scientifiques à l'égard de l'utilisation intensive de ces pesticides, notamment en termes d'impact sur la santé et l'environnement. Ce constat fut confirmé dans les années qui suivirent [21] sur les organismes aquatiques [22], les oiseaux [23] et sur la santé humaine [24]. À partir de ce moment, une conscience collective sur la protection de l'environnement se développe, prenant en compte la préservation de la santé de l'ensemble des écosystèmes, des sols jusqu'aux êtres humains. Dans les pratiques agricoles, cela se traduit par différentes stratégies de réduction des intrants (produits agricoles qui ne sont pas naturellement présents dans le sol), comme dans l'agriculture biologique, ou l'agriculture raisonnée. Dans ce même cadre, des limitations et interdictions d'usage de certaines molécules qui composent les pesticides chimiques ont été mises en place afin de protéger l'ensemble des écosystèmes (Ecophyto 2018 in France, European directives 2009/128/CE). L'objectif est de mettre en place une agriculture durable, respectueuse de la planète, tout en garantissant une alimentation suffisante, riche et variée pour une population toujours grandissante. Deux disciplines sont donc associées, l'écologie et l'agronomie pour fonder l'agroécologie [25].

I.2. Lutte biologique moderne

Lorsque l'on parle de lutte biologique, cela fait en général référence à l'utilisation de pathogènes ou de prédateurs naturels pour lutter contre les ravageurs en agriculture ou en sylviculture [26,27]. Cependant, la définition donnée par l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique) est plus large, incluant aussi la santé animale et humaine : « Utilisation par l'homme d'ennemis naturels tels que des prédateurs, des parasitoïdes ou des agents pathogènes pour contrôler des populations d'espèces nuisibles et les maintenir en dessous d'un seuil de nuisibilité » [1]. Il a été reconnu que ces agents de biocontrôle sont intrinsèquement moins toxiques pour l'environnement que les pesticides chimiques.

L'étude des pathogènes d'insectes fut très empiriques avant la découverte du lien de causalité entre microorganisme et effet pathogène. Ce lien fut seulement établi en 1835, suite aux études de Bassi [28] sur le champignon *Bauveria bassiana* et de Louis Pasteur en 1870 sur la pébrine du ver à soie [29]. C'est grâce à ces mêmes travaux que ce dernier prend conscience de l'importance de l'hygiène pour limiter la propagation des épidémies et établit des règles de prophylaxie encore suivies aujourd'hui.

Paradoxalement, les connaissances des maladies entomopathogènes (d'étymologie « *entomon* » qui signifie insecte) sont bien plus anciennes. Les premières descriptions à notre connaissance remontent au poème « *De Bombyce* » de Marc-Jérôme Vida en 1527, qui décrit la flacherie du ver à soie et qui propose un mécanisme de transmission par la nourriture [30]. De la même manière, des épizooties naturelles ont été observées chez les chenilles de *Lymantria monacha* (Lepidoptera : Lymantriidae), décrites comme « *Wipfelkrankheit* » ou « *wilt disease* », qui peut se traduire par « la maladie du sommet des arbres » [31].

Ces premières observations suggèrent que la maladie peut induire un comportement particulier sur l'hôte, ici ce dernier favorise la dispersion virale. En 1926, Paillot découvre chez *Pieris brassicae* (Lepidoptera : Pieridae) les granulovirus. Il les décrit alors comme de très petites particules [32]. Suite à ces travaux, il généralise le dépistage systématique de microorganismes dans les élevages d'insectes et notamment en sériculture. Quelques années après, en 1947, d'autres maladies entomopathogènes ont été décrites comme des maladies à polyèdre par Bergold [33].

La nature virale de ces maladies a été mise en évidence avec le développement des techniques de filtration, d'où l'appellation de particule « ultrafiltrante » [34]. Aujourd'hui, la définition des virus utilisée est celle donnée en 1953 par André Lwoff, qui les qualifie de parasites intracellulaires obligatoires. Tous les virus possèdent de l'information génétique, soit sous forme d'ADN, soit sous forme d'ARN et sont dépourvus de noyau ou de cytoplasme. Cette information est associée à des protéines organisées en capsides. Les virus sont incapables de grandir ou de se diviser, et multiplient uniquement leur matériel génétique [35].

Les premières utilisations de baculovirus en vergers ont débuté en 1892 en Allemagne pour contrôler *Lymantria monacha* (Lepidoptera : Lymantriidae) [36] et sur le continent américain en 1913 pour contrôler *Bombyx dispar*, *Lymantria dispar* (Lepidoptera : Lymantriidae) [37]. À cette époque, la production d'inoculum pour contrôler les ravageurs était empirique et se faisait à partir de larves mortes récoltées directement sur le terrain.

La mouche scie des épinettes *Gilpinia hercyniae* (Htg.), fut introduite au Canada accidentellement en 1922, et s'est rapidement transformée en un véritable fléau, motivant des recherches pour son contrôle à partir de 1933 [38]. Le nucléopolyédrovirus (NPV) qui lui est spécifique a probablement été importé en même temps que l'introduction de cet hyménoptère [39]. Balch et Bird, ont observé en 1944 la présence de polyèdres dans *G. hercyniae* (Htg.) et leur rôle dans le contrôle des populations de ce ravageur au Canada [40,41]. Rapidement, l'utilisation volontaire de son potentiel de contrôle a été expérimentée [42].

Progressivement d'autres virus entomopathogènes ont été découverts (Tableau 1). Aujourd'hui, on recense des virus appartenant à au moins 40 familles [43]. Au même titre que les baculovirus, leur potentiel comme agents de biocontrôle a été étudié.

En 1958 et 1959, le potentiel de contrôle des populations de *Thaumetopoea pityocampa* (processionnaire du pin) par un Cypovirus (CPV) a été étudié pendant 2 ans au mont Ventoux (France). 500 hectares ont été traités pendant deux ans. La première année, une mortalité de 80% a été obtenue. En revanche l'année suivante aucune trace de virose n'a été détecté parmi les populations de ravageurs [44]. Finalement, la pathogénicité des Cypovirus a semblé trop faible, et ils n'ont pas suscité beaucoup d'intérêt comme agents de contrôle biologique [45]. En 1965, un Densovirus (DNV appartenant aux *Parvoviridae*) était appliqué comme insecticide microbien dans les ruches d'abeilles pour l'élimination de

Galleria mellonella (Lepidoptera : Pyralidae) [46]. D'autres essais avec des DNV ont été réalisés en 1971 sur des palmiers en Malaisie sur les populations de *Sibine fusca* (Lepidoptera : Limacodidae) [47], puis en 1981, sur des milliers d'hectares en Colombie [48]. En 1970, un virus ressemblant à un « Baculovirus non occlus » (découvert en 1963 en Malaisie, aujourd'hui classé comme Nudivirus) a été utilisé avec succès sur l'île Wallis (îles du Pacifique) contre le coléoptère *Oryctes rhinoceros* (introduit accidentellement en 1909) [49].

À partir des années 70, des questions sur les risques d'utilisation des virus dans l'environnement ont émergé. La WHO (World Health Organization) a proposé en 1972 des guides pour tester la sécurité des virus entomopathogènes [50]. Entre cette date et 1981, plusieurs équipes ont travaillé sur le contrôle qualité nécessaire pour autoriser leur utilisation. En 1981, le *Memorandum* de la WHO a concrétisé ces réflexions [51,52], mettant un frein à la recherche sur l'application des iridovirus, des CPV, des DNV et des EPV. La sécurité d'utilisation des baculovirus a été confirmée par plusieurs rapports, dont celui de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) [53]. La recherche s'est donc centrée d'avantage sur les baculovirus pour leur utilisation comme outils biotechnologiques [54,55], leurs qualités comme insecticides biologiques et leurs spectres d'hôtes très étroits [56,57]. À ce jour les baculovirus sont les seuls virus entomopathogènes commercialisés [58].

Tableau 1 : Liste des découvertes de virus entomopathogènes et de leurs activités non désirées (non exhaustive) [59]. OB désigne « occlusion body » (voir définition dans la partie II les baculovirus).

Famille	Genre	Date découverte	Acide nucléique	Présence d'OB	Activités aspécifique identifiées
<i>Baculoviridae</i>	Baculovirus	1527 [30]	ADN	+	Pas d'infection chez les vertébrés [51,53] Mais production d'anticorps retrouvée chez les mulots [60,61]
<i>Reoviridae</i>	Cypovirus (CPV)	1934 [62]	ARN	+	Similitudes entre les réovirus des insectes et ceux isolés sur des vertébrés [52]
<i>Iridoviridae</i>	Iridovirus	1954 [63]	ADN	-	Similitudes entre les iridovirus des insectes et ceux isolés sur des vertébrés [52]
<i>Nudiviridae</i>	Nudivirus	1963 [64]	ADN	-	-
<i>Parvoviridae</i>	Densovirus (DNV)	1964 [65]	ADN	-	Se multiplie sur les cellules de mammifères [66,67]
<i>Picornaviridae</i>	Picornavirus-	1966 [68]	ARN	-	-
<i>Nodaviridae</i>	Nodavirus	1967 [69]	ARN	-	Le virus Nodamura se réplique dans diverses cellules de vertébrés, chez les souris et chez les abeilles [70]
<i>Poxviridae</i>	Entomopoxvirus (EPV)	1971 [71]	ADN	+	Multiplication dans les cellules de vertébrés [72]

II. BACULOVIRUS

I.3. Classification et structure

Les baculovirus constituent l'un des groupes les plus diversifiés et les plus étudiés [73]. À ce jour, des baculovirus ont été isolés à partir de plus de 600 espèces d'hôtes [74]. Ils sont spécifiques aux arthropodes, et plus précisément aux insectes lépidoptères, hyménoptères et diptères [75]. Ils possèdent un génome à ADN circulaire de 80 à 180 kb. Dans l'ancienne classification (6^{ème} rapport de l'ICTV [76]), les baculovirus étaient divisés en deux genres, les NPV et les granulovirus (GV), se différenciant par la forme du corps d'occlusion : polyèdre contenant un grand nombre de virions co-occlus chez les NPV ; et granule, contenant 1 ou un faible nombre de virions chez les GV [77]. Cette taxonomie a été révisée avec les données provenant des analyses de phylogénie des gènes conservés, de la présence de gènes spécifiques, du spectre d'hôtes et de la morphologie du corps d'occlusion. Les baculovirus se séparent en quatre branches, dont une pour les GV. Les trois autres branches ne sont pas phylogénétiquement proches, mais correspondent à des embranchements anciens : les baculovirus inféodés aux diptères, ceux inféodés aux hyménoptères, et ceux inféodés aux lépidoptères, qui se subdivisent entre les NPV de lépidoptères et les GV (tous des lépidoptères) [78] (Figure 4).

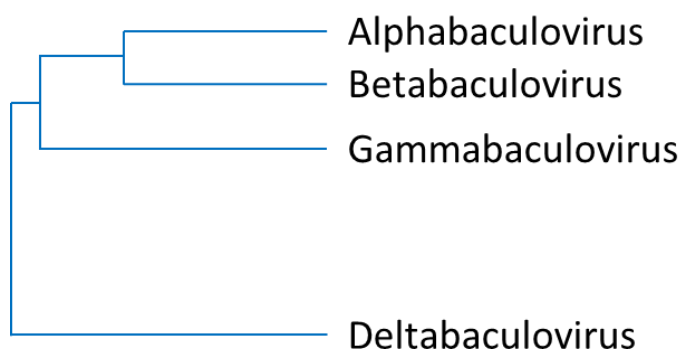


Figure 4 : Arbre phylogénétique des baculovirus [78].

À l'intérieur des corps d'occlusion (Occlusion bodies, OB) des baculovirus se trouvent des virions qui seront libérés lors de la dissolution de ces corps d'occlusion (*occlusion derived virus*). Ces virions se forment dans le noyau de la cellule, où une ou plusieurs nucléocapsides sont entourées par une enveloppe qui contient au moins 13 protéines membranaires spécifiques auxquelles jouent un rôle essentiel dans l'infection orale [79]. Dans l'environnement, les OB sont responsables de la transmission entre hôtes (Figure 5). L'occlusion est une adaptation qui permet d'augmenter la viabilité des baculovirus dans l'environnement. La stratégie d'occlusion est présente dans trois familles virales infectant des insectes (Entomopoxvirus et Cypovirus). Elle a évolué de façon indépendante (convergence évolutive) [80]. Les OB des baculovirus sont ceux qui présentent la plus grande complexité. Chez les nucléopolyédrovirus multiples, chaque OB peut contenir plusieurs ODV, et chaque ODV plusieurs nucléocapsides [75].

Les MNPV (*multiple nucleopolyhedrovirus*) et les SNPV (*single nucleopolyhedrovirus*), contrairement aux GV, peuvent contenir une douzaine de virions co-occlus (1 seul chez les GV). La désignation de « multiple » chez les MNPV provient du fait que les virions contiennent plusieurs nucléocapsides. La principale protéine constitutive des OB diffère aussi entre NPV et GV : la polyédrine pour les NPV et la granuline pour les GV [77].

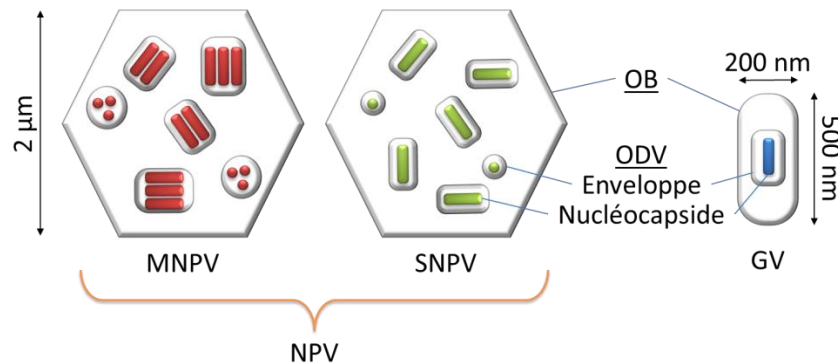


Figure 5 : Structures des différents baculovirus : NPV et GV.

Tous les baculovirus ont la particularité de présenter deux morphotypes au cours du cycle d'infection : les virions dérivés des corps d'occlusion (ODV), et les virus bourgeonnants (BV, *budded virus*). Ces deux morphotypes sont génétiquement similaires mais possèdent des structures et des fonctions différentes [79] (Figure 6). Les ODV et les BV jouent des rôles distincts au cours de l'infection virale, les ODV initient l'infection primaire dans les cellules intestinales une fois les OB ingérés et dissouts dans l'intestin. Les BV sont responsables des infections secondaires (section 1.4). Les deux morphotypes ODV et BV sont des virions enveloppés. L'origine et la composition des enveloppes des ODV et BV ne sont pas similaires (contrairement au ODV, l'enveloppe des BV est acquise lors du bourgeonnement à travers la membrane cytoplasmique). Les ODV peuvent renfermer une ou plusieurs nucléocapsides (en général 1 pour les SNPV et GV, entre 1 et 25 nucléocapsides pour les MNPV [81]). Chez les BV, l'enveloppe ne contient qu'une seule nucléocapside (Figure 6).

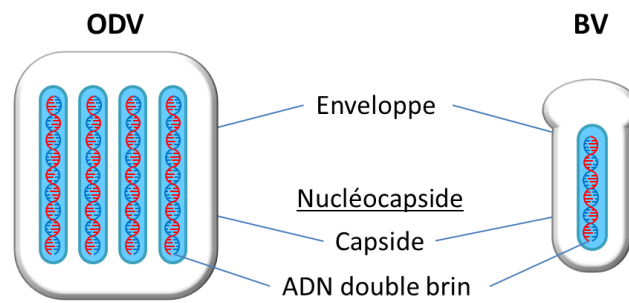


Figure 6 : Les différents morphotypes des baculovirus retrouvés au cours du cycle d'infection.

I.4. Cycle d'infection

La production des deux morphotypes est finement régulée au cours des différentes étapes d'infection du baculovirus. Le cycle est composé de 2 étapes : l'infection primaire et l'infection secondaire (ou systémique) (Figure 7).

I.4.1. L'infection primaire

Lors de l'infection primaire, les OB sont ingérés par la larve et dissous dans l'intestin grâce au pH alcalin (pH = 10-11), entraînant la libération des ODV (dans les 12 min après l'entrée des OB). Les ODV franchissent la membrane péritrophique (MP) grâce sa dégradation partielle. Cette étape est cruciale pour le virus, en effet, la MP (membrane constituée principalement de chitine et de mucines) est le principal obstacle à l'infection des ODV. Pour la franchir, une dégradation partielle est nécessaire, grâce à des enzymes contenues dans l'OB, notamment des métallo protéases, qui font partie des VEF (*viral enhancing factors*) [79]. D'autres protéines sont essentielles dans l'infection des cellules intestinales : les protéines PIF (*per os infectivity factor*). À ce jour 9 protéines PIF sont connues numérotées de 0 à 8. Elles sont impliquées dans la fusion de l'enveloppe de l'ODV à la membrane de la cellule intestinale, et leur délétion a pour effet d'abolir ou réduire grandement l'infectiosité de l'ODV. Ce n'est pas pour autant que toutes ces protéines ont été détectées dans la membrane de l'ODV. Il semble que le rôle de certaines est d'assurer la bonne localisation des autres dans la membrane [79].

Une fois que l'enveloppe des ODV a fusionné avec la membrane des cellules intestinales, les nucléocapsides sont libérées dans le cytosol et migrent grâce aux filaments d'actine. Chez certains MNPV (ex : AcMNPV), il a été montré que la disposition des filaments du cytosquelette dans les cellules intestinales est particulière : il y a des filaments qui sont orientés vers le noyau, et d'autres qui sont orientés vers la partie basale de la cellule intestinale. Cette orientation particulière pourrait expliquer pourquoi certaines nucléocapsides migrent vers les pores nucléaires et d'autres directement vers la base des cellules intestinales [82]. Dans le cas où les nucléocapsides migrent :

- vers le noyau, l'ADN viral y est libéré et répliqué. Les néo-BV sont produits à partir de 8 heures [83].
- vers la membrane basale des cellules intestinales. Les BV sortent de la cellule 1 à 2 heures après l'avoir infectée [84] et permettrait ainsi de compenser la desquamation des cellules intestinales en accélérant l'apparition de BV [85], c'est ce qu'on appelle l'effet de passage (pour plus de détails voir III.1). Washburn *et al.* ont démontré que l'encapsidation multiple chez AcMNPV permet d'accélérer l'infection secondaire (les premiers BV sont détectés dans l'hémolymphe 2 heures post infection) [86], probablement grâce à l'effet de passage.

La réplication cellulaire commence dès que l'ADN du virus atteint le noyau de la cellule infectée [87]. L'expression du génome des baculovirus est régulée. Les gènes viraux sont divisés en 4 classes en fonction de leurs périodes d'expression [88,89] :

- Les gènes précoces immédiats (IE, *immediate early gene*), sont ceux dont l'expression commence juste après l'infection de la cellule et sont détectés 30 min post infection [87].
- Les gènes précoces retardés (DE, *delayed early gene*) [90], sont ceux dont l'activité est amplifiée grâce à l'expression préalable des gènes *ie* et sont principalement impliqués dans la réplication de l'ADN du virus et l'inhibition des défenses de l'hôte.
- Les gènes tardifs (L, *late gene*), sont ceux qui requièrent absolument l'expression des gènes *ie* et *de* et sont des gènes structuraux pour les nucléocapsides et sont aussi impliqués dans la sortie du BV.
- Les gènes très tardifs (VL, *very late gene*), codent pour les protéines impliquées dans la formation des OB. Ils sont exprimés en fin de cycle et qui requièrent l'expression préalable des *late* [91].

L'infection primaire prend fin lors du bourgeonnement des BV, spécialisés dans l'infection des autres tissus que celui de l'épithélium intestinal. Les cellules intestinales des insectes sont renouvelées fréquemment grâce à des cellules régénératrices qui se divisent et différencient en continu. Ces cellules en brosse se desquament et sont libérées dans l'intestin. La desquamation des cellules épithéliales intestinales est importante lors de la digestion et du renouvellement cellulaire en raison de la croissance du tube digestif à chaque stade de l'insecte. Chez certaines espèces d'insectes, la desquamation peut être accélérée en cas d'intoxication [92]. Chez *Bombyx mori* celle-ci peut intervenir entre 30 et 90 min après intoxication. Il est donc supposé que le succès de l'infection primaire par certaines espèces de NPV repose sur la rapidité du virus à franchir la barrière intestinale et que ce temps doit être inférieur à celui de la desquamation des cellules épithéliales intestinales. C'est pourquoi l'effet de passage est une stratégie d'infection importante chez les MNPV (pour plus de détails voir III.1).

Quant aux GV, il n'y a pas de donnée sur les mécanismes impliqués lors de l'infection primaire. Comme les stratégies semblent être différentes de celles des NPV, on peut émettre plusieurs hypothèses : soit, comme les NPV, des stratégies d'infection virale permettent de franchir rapidement la barrière intestinale, soit les virus sont capables de ralentir la desquamation des cellules soit les GV infectent des espèces d'insectes pour lesquels la desquamation intestinale est déjà plus lente.

1.4.2. L'infection secondaire

L'infection secondaire, ou infection systémique, est initiée à partir de 12 hp.i. (heures post infection). Elle débute lorsque les BV sont produits et sortent des cellules intestinales par la membrane basale. Deux protéines sont importantes dans l'infectivité des BV : la GP64 et la protéine F. Ces deux protéines de fusion sont différentes selon l'espèce de baculovirus (la GP64 est présente uniquement chez les NPV du groupe I). Les BV infectent en premier le système respiratoire (système trachéal) de l'insecte [93]. Une fois les trachéoles infectées, le virus se répand dans l'hémocœle avec l'infection des hémocytes (impliqués dans la réponse immunitaire de l'insecte). L'infection est rapidement généralisée à l'ensemble des tissus. Pratiquement toutes les cellules de l'hôte sont infectées. La formation de nouveaux ODV est initiée dans le stroma virogène qui se condense à partir de 20 hp.i. À 24 hp.i, les OB sont formés dans le noyau et sont libérés à partir de 48 hp.i. S'ensuit la liquéfaction des tissus et la mort de la larve [75,79]. Ces OB se retrouvent alors dans l'environnement extérieur et le cycle d'infection recommence (Figure 7).

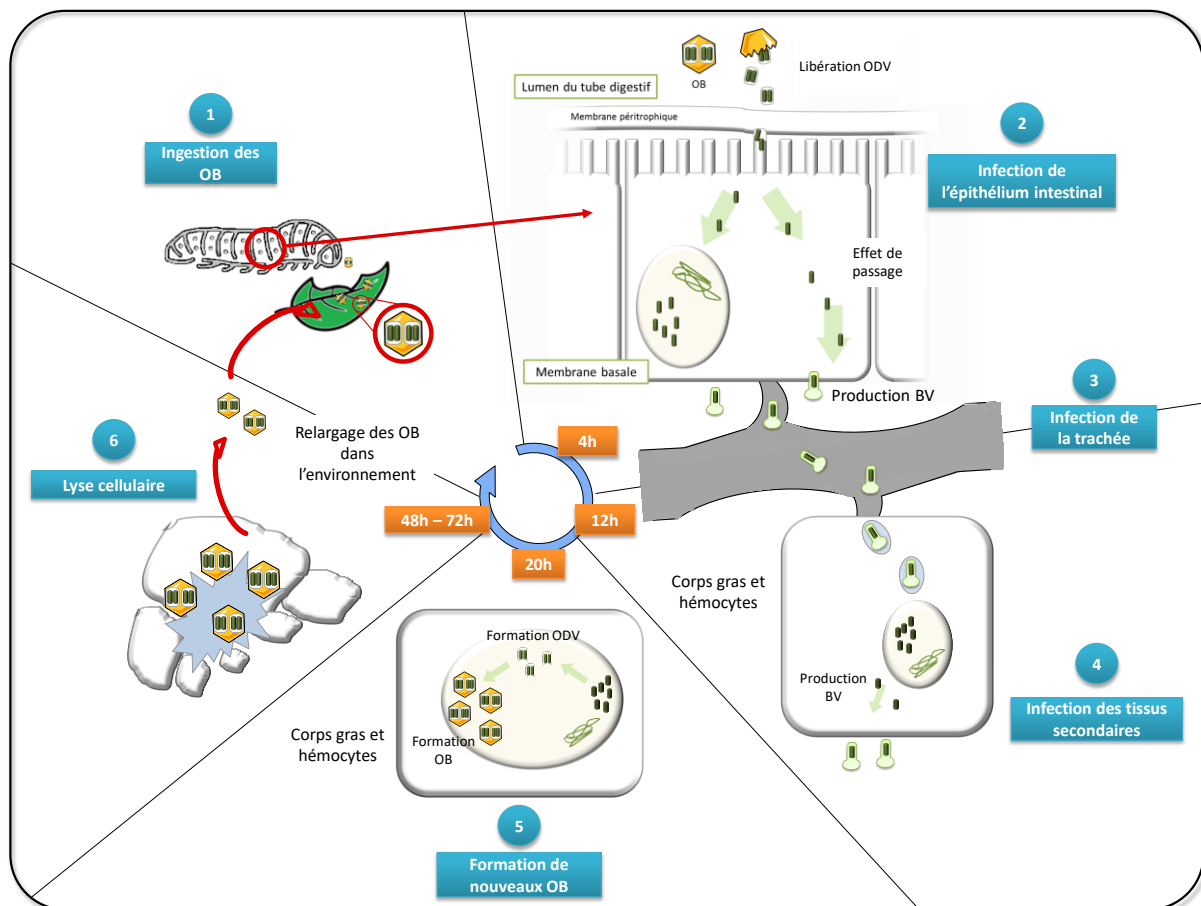


Figure 7 : Cycle d'infection des baculovirus. Inspiré de [94].

I.5. Principaux gènes et protéines viraux

À l'heure actuelle, les génomes de 78 espèces appartenant à la famille des *Baculoviridae* ont été séquencés (48 Alphabaculovirus, 25 Betabaculovirus, 3 Gammabaculovirus, 1 Deltabaculovirus et 1 non classifié) [95]. Le génome des baculovirus contient entre 90 et 180 gènes, qui codent pour 100 à 200 protéines [78]. Parmi ces gènes, 38 sont conservés entre les différentes espèces de baculovirus. Ils sont répartis en 3 catégories liées à leurs fonctions : les gènes impliqués dans le cycle viral, ceux qui codent pour des protéines de structures et ceux qui permettent le contrôle des défenses de l'insecte. Les principaux gènes sont référencés dans la liste ci-dessous (pour une liste plus exhaustive voir l'étude de Rohrmann [96]) :

- Les gènes qui codent pour des **protéines du cycle viral** (réplication, transcription et traduction) :
 - La DNA polymérase joue un rôle important lors de la réplication de l'ADN [97].
 - Le génome du baculovirus est étroitement associé à la protéine basique P6.9 utilisée pour l'empaquetage de l'ADN dans la nucléocapside [98]

- Les hélicases catalysent l'ouverture de l'ADN et les ligases catalysent la jonction entre deux molécules d'ADN. Ensembles, elles sont impliquées dans la réplication, la transcription, la réparation, la recombinaison et la conjugaison de l'ADN [99].
- Les gènes *ie* et *pe38* sont des transrégulateurs précoces [100]. *ie* est impliqué dans la régulation de *polh* et de *vp39* (code pour la protéine vp39, composant majoritaire de la nucléocapside) [101]. *pe38* est aussi impliqué dans la mort cellulaire induite par IE-1 [102].
- Les gènes *lef* (*late expression factor gene*) sont définis comme des gènes dont l'inactivation a comme conséquence l'absence ou la diminution notable de l'expression des gènes tardifs, pouvant conduire à des infections abortives. Il s'agit donc d'une classification fonctionnelle. Leur activité est variée, certains sont impliqués dans la réplication de l'ADN (*dnapol*), dans la production des ARNm tardifs (*lef-4*) [79].
- Les gènes *viral-cathepsin* et *chiA* (chitinase) codent pour les protéases V-CATH et CHIA qui provoquent la liquéfaction de l'insecte [103].
- Les gènes qui codent pour des **protéines structurales** :
 - Les protéines GP64 et F sont présentes sur les BV et permettent la fusion de ces BV avec les microvillosités de l'intestin lors de l'infection secondaire [104].
 - La plupart des autres protéines de structure sont produites en fin de cycle d'infection et sont utilisées pour la formation des ODV et des OB (VL gène) :
 - Le gène *vp39* code pour la protéine VP39, qui est un des composants majeurs de la nucléocapside des ODV et BV.
 - Les protéines PIF et p74 sont des protéines des ODV et jouent un rôle important dans l'infectivité orale des baculovirus [105].
 - Le gène *v-ubi* (ubiquitine) code pour des protéines présentes sur les BV comme sur les ODV. Ces protéines facilitent la sortie de la nucléocapside [106].
 - Les gènes *polh* et *gran* codent pour la polyédrine (NPV) ou la granuline (GV) sont les protéines majoritaires des OB. La protéine p10 est aussi utile à la formation des OB [75].
- Les gènes qui permettent de **contourner les défenses de l'insecte** :
 - Les gènes *iap* (*inhibitor of apoptosis*) et *p35* codent pour des protéines anti-apoptotiques [100,107].
 - Le gène *egt* (*ecdysteroid glucosyltransferase*) : code la protéine EGT qui inactive l'hormone ecdystéroïde. Cette hormone permet normalement la mue des insectes [108].
 - Les gènes *vfgf* (*viral fibroblast growth factor*) : Les protéines FGF sont impliquées dans une cascade de signaux qui permettrait d'accélérer l'infection systémique [109]. L'absence de *vfgf*, comme c'est le cas chez les Gammabaculovirus et les Deltabaculovirus, entraîne une restriction d'infection des virus à l'intestin moyen [110].

I.6. Populations naturelles de baculovirus

I.6.1. Identification de la diversité au sein des NPV

Les études sur l'évolution des baculovirus concluent à une adaptation très ancienne entre chaque virus et son hôte, probablement concomitante avec la spéciation de ce dernier. Les arthropodes sont apparus il y a plus de 450 millions d'années [111]. La longue coévolution entre les baculovirus et leurs hôtes a conduit à une spécificité d'hôtes très restreinte [112] et est à l'origine du grand nombre d'espèces de baculovirus. Tout comme certaines espèces d'insectes ayant des distributions géographiques très étendues ou discontinues, des différences génétiques existent entre les virus qui leurs sont inféodés. Les premières études ont été faites sur *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) et son virus S. frugiperda NPV [113,114] et *Malacosoma disstria* (Lepidoptera : Lasiocampidae) et M. disstria NPV [115] où des différences entre les profils de restriction des génomes ont été observées. Ces différences traduisent une variabilité génétique entre les isolats de populations géographiquement éloignées [116].

Entre les années 1980 et 2000, la tendance majeure a été de cloner un seul variant génétique du virus pour permettre sa caractérisation approfondie jusqu'au séquençage complet de génomes. La première publication d'un génome complet de baculovirus, celui d'AcMNPV, remonte à 1994 [117].

Au cours des années 2000, les nouvelles techniques de caractérisation ont permis d'explorer la structuration des populations de baculovirus grâce à l'analyse d'un nombre plus important d'échantillons de terrain, à l'analyse individuelle de chaque larve, ainsi qu'à l'étude plus poussée de leur variabilité génétique.

En 2003, des échantillonnages ont été faits pour le SpltNPV à partir de larves de la noctuelle rayée, *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) récoltées au Japon, au Viêt-Nam, en Malaisie et en Inde. Les génomes des baculovirus ont été extraits et analysés par polymorphisme de taille des fragments de restriction (*Restriction fragment length polymorphism*). Cette analyse a montré des différences entre les isolats. De plus, 6 isolats sur 10 analysés ont montré la présence de bandes sub-molaires, ce qui suggère que ces isolats sont des mélanges de plusieurs génotypes à des fréquences différentes [118,119].

Chez *Malacosoma californicum pluviale* (Lepidoptera : Lasiocampidae), des échantillonnages ont été faits dans des populations d'insectes géographiquement isolées, chaque larve ayant été analysée individuellement. Cette analyse a révélé 14 variants génétiques parmi 48 isolats [120].

Des travaux sur la diversité des populations de OpbuNPV (*Operophtera brumata* nucléopolyédrovirus) isolées à partir de la teigne d'hiver, *O. brumata* (Lepidoptera : Geometridae), ont été réalisés dans les îles Orkney (Écosse). Parmi 15 sites d'échantillonnage, 11 ont permis la collecte d'isolats viraux et 26 variants génotypiques ont été identifiés. La plupart des isolats de OpbuNPV étaient constitués de plusieurs variants, mais l'analyse n'a pas décelé de diversité à l'intérieur de chaque larve,

dans la limite de la capacité de résolution des techniques utilisées [121]. Dans chaque larve, la réplication d'un seul génotype a été détectée, mais la population virale maintient sa diversité génétique, toutes les larves ne répliquant pas le même génotype. Les auteurs suggèrent que la sélection se ferait au niveau de chaque larve individuellement.

Dans d'autres couples virus-insecte, des cas de coinfection ont été recensés sur des individus uniques. Par exemple, 24 variants génotypiques PaflNPV ont été détectés dans une seule larve de *Panolis flammea* (Noctuelle du pin, Lepidoptera : Noctuidae) provenant du Royaume-Uni [122,123]. Des études sur ce virus ont montré que selon l'espèce de plante, les génotypes de PaflNPV sont sélectionnés différemment [124]. Ceci suggère que la diversité génétique des populations virales serait régulée par l'environnement dans lequel évolue la population hôte.

Le développement des cultures cellulaires et des techniques d'ingénierie du génome ont permis des analyses de l'infection au niveau cellulaire (en utilisant surtout le modèle des baculovirus *Autographa californica multiple nucléopolyédrovirus*, AcMNPV). Des virus recombinants dépourvus du gène de la polyédrine ont été produits (AcMNPV- $\Delta polh$). Ces virus ne produisent pas d'OB, et par conséquent, ne peuvent pas survivre dans l'environnement. Il fut observé que lors d'une infection de cultures cellulaires avec des mélanges de AcMNPV- $\Delta polh$ contenant un gène étranger et du phénotype sauvage AcMNPVwt (qui produit des OB), les OB produits contenaient des virions porteurs du gène étranger, ce qui implique que des cellules ont été infectées par les deux génotypes viraux [125]. En 1990, une analyse plus poussée a permis de conclure que des nucléocapsides de deux génotypes différents peuvent se trouver enveloppées dans le même virion, et donc, que les OB d'AcMNPV peuvent transporter plusieurs génotypes [126] (Figure 8).

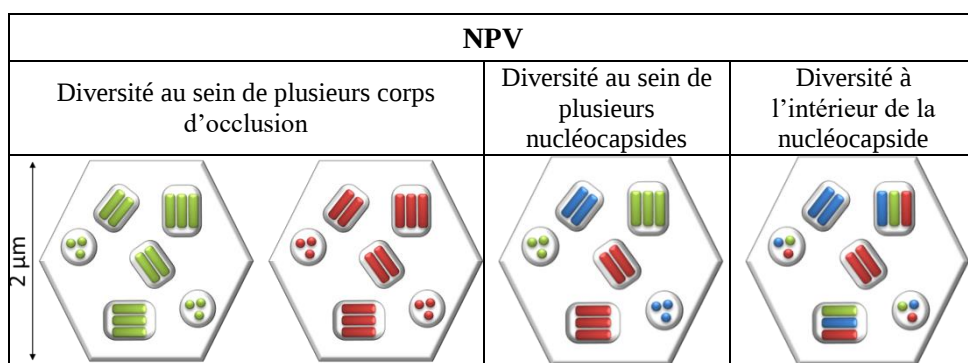


Figure 8 : Les différentes échelles de diversité génétique possibles retrouvées au sein des NPV.

Des travaux mathématiques sur la coinfection et la co-occlusion chez AcMNPV ont permis d'établir des modèles du cycle d'infection [127–129]. Ils ont confirmé le maintien de variants génétiques lors d'infections en larves *via* la coinfection des cellules et la co-occlusion. Ils ont conclu à un niveau de

coinfection de 4,3 BV par cellule chez les larves de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae) infectées ; ce qui correspond au nombre qui garantit l'infection de pratiquement toutes les cellules de l'insecte (hypothèse d'infection indépendante, et donc, de loi binomiale). Il a aussi été démontré que les cellules Sf9 infectées par une particule de AcMPNV sont permissives à l'entrée d'autres particules seulement pendant un temps limité après l'entrée du premier virus (dû au réarrangement des filaments d'actine) [130]. Cette infection multiple au niveau des cellules semble être la règle chez les baculovirus. Par ailleurs, la présence de plusieurs génotypes dans une même larve semble aussi être fréquente.

1.6.2. Cette diversité est aussi présente dans les populations de GV

La diversité génétique chez les GV a été moins étudiée que celle des NPV. En effet, pendant longtemps la variabilité génétique des GV semblait être plus faible, voire inexistante pour certaines espèces virales. De plus, le manque de modèles cellulaires a rendu plus difficile leur étude.

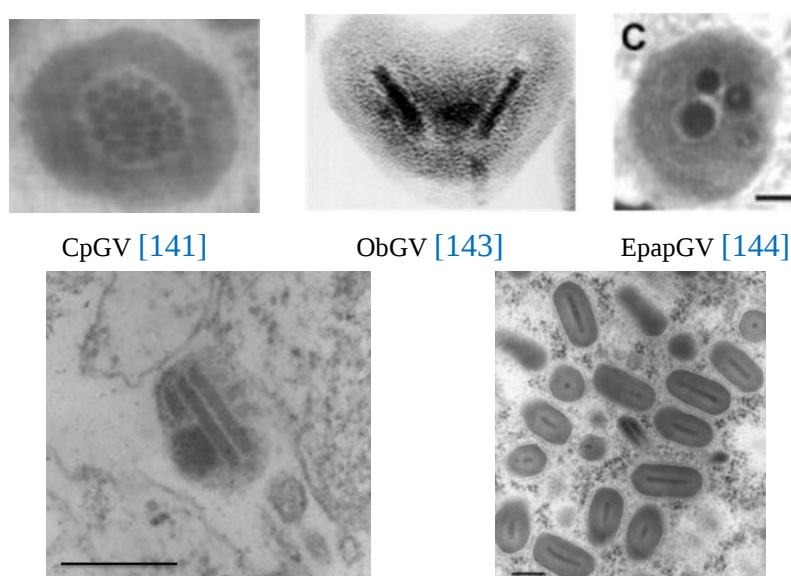
Cependant, quelques études sur la diversité ont tout de même été réalisées sur les GV. En 1985, sept isolats de *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) ont été récoltés dans différentes régions du monde. Les auteurs remarquent des petites différences dans le profil de restriction des génomes, ce qui leur permet de les classer en trois types, représentés par trois isolats : l'isolat mexicain (CpGV-M), l'isolat russe (CpGV-R) et l'isolat anglais (CpGV-E). Cependant, les trois isolats étaient pareillement efficaces face au carpocapse [131]. En 1986, 11 variants génotypiques de *Artogeia rapae granulovirus* (ArGV) étaient identifiés à partir de 15 isolats géographiques sur la piéride de la rave *Artogeia rapae* (Lepidoptera : Pieridae). Deux isolats présentaient des bandes submolaires suggérant de multiples variants génotypiques au sein de cet isolat [132].

La teigne de la pomme de terre, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera : Gelechiidae), a été introduite en France à partir de 1906 et a causé des dégâts à partir de 1911 [133]. En 1962, au Sri Lanka, de Silva isole un granulovirus sur des larves de *P. operculella* [134]. Le potentiel de contrôle de ce ravageur en champ est vite exploré [135]. Dès 1981, des différences de susceptibilité entre des populations de la teigne pour chaque isolat viral ont été identifiées [136]. Ces différences ont amené à chercher des isolats viraux là où les populations d'insectes se trouvent, ce qui a conduit à la disponibilité d'un grand nombre d'isolats. En 1991, trois variants génotypiques ont été identifiés parmi huit isolats géographiques (Pérou, Tunisie et Inde) [137]. En 1998, en utilisant des cultures cellulaires de l'insecte hôte, cinq clones différenciables par leur profil de restriction furent séparés à partir de l'isolat Tunisien [138], confirmant la présence d'une diversité génétique sous-estimée.

Dans les populations de PlxyGV isolées sur le ravageur *Plutella xylostella* (Teigne du chou, Lepidoptera : Plutellidae) 95 isolats ont été récoltés dans différentes parcelles du Kenya, 14 ont montré des différences génotypiques [139].

De plus, une certaine diversité a été constatée du point de vue fonctionnel. Des GV, isolés à partir de 6 espèces de Noctuelles, se sont avérés être des variants génétiques de *Xestia c-nigrum granulovirus* (XecnGV) [140].

Les OB des GV contiennent normalement un seul virion avec une seule nucléocapside. Cependant, lors de l'étude du processus d'infection des GV, des cas d'encapsulation multiple ont été observés chez CpGV [141,142], chez ObGV [143] et chez EpapGV [144] (Figure 9). Les conditions d'apparition et la fréquence de ce phénomène restent encore méconnues et ne permettent pas de définir son importance biologique, notamment dans le maintien de la diversité.



CpGV. Photographies obtenues par M. Berling et I. Bornard, 2009. Échelle = 200 nm

Figure 9 : Cas d'encapsidations multiples recensés chez les espèces : CpGV, ObGV et EpapGV.

I.6.3. Quel est le rôle de cette diversité ?

I.6.3.1. Stratégie commune : arriver à une infection secondaire

Du point de vue du maintien de la diversité, la stratégie « polyèdre » est plus efficace que la stratégie « granule » en conditions de coinfection de la larve et de faible prévalence du virus. Les deux stratégies « simple » ou « multiple » arrivent aux mêmes résultats, parvenir à une infection secondaire. Leurs différences se jouent uniquement sur le moyen d'atteindre cet objectif. C'est un avantage considérable pour les baculovirus de pouvoir infecter avec une grande quantité de virions en même temps [75]. Chez les MNPV, les virions peuvent contenir plus de 40 nucléocapsides [145].

L'infection des cellules intestinales est l'un des goulots d'étranglement (bottleneck) dans le cycle d'infection. Il suffit qu'un seul BV arrive dans l'hémolymphe de la larve pour assurer l'infection de toutes les cellules. Après la dissolution des OB dans le tube digestif moyen des larves, les virions libérés détruisent partiellement la membrane péritrophique et fusionnent avec les microvillosités des cellules intestinales, démarrant l'infection. Cet événement est rare, un faible nombre de cellules intestinales sont infectées [146] et ces cellules ont une durée de vie limitée, souvent inférieure au temps de réplication du virus.

Une comparaison entre la dynamique d'infection des cellules intestinales chez les MNPV, dont les ODV contiennent plusieurs nucléocapsides et les SNPV, qui ont des ODV avec une seule nucléocapside, a été faite par l'équipe de Volkman. Chez les MNPV, les ODV, plus grands, infectent moins des cellules que les SNPV, qui présentent des ODV plus petits. Par contre, l'initiation de l'infection secondaire est plus rapide chez les MNPV. Le succès final semble comparable entre les deux systèmes, mais les stratégies sont différentes [83,86], voir Figure 16. Dans un cas comme dans l'autre chez les NPV (MNPV ou SNPV), le maintien de la diversité à l'entrée dans la larve peut reposer sur l'ingestion d'un seul OB, pourvu que cet OB ait été produit en conditions de coinfection.

L'intérêt de l'occlusion de plusieurs virions dans un OB apparaît clair d'un point de vue populationnel, en permettant la sauvegarde d'une diversité génétique même dans des conditions de faible prévalence d'infection. Mais cette stratégie a un coût : le nombre d'OB dispersés dans l'environnement est plus faible si les virions sont regroupés dans une seule unité que s'ils sont indépendants. En effet, il y a environ 100 fois plus d'OB chez les GV (OB contenant en majorité un seul virion) que chez les NPV (regroupements de virions dans un seul OB), pour le même nombre total de génomes.

I.6.3.2. Avantages de la diversité virale

Des différences d'activité biologique ont rapidement été mises en évidence entre les différents isolats des NPV [147] et des GV [148] testés sur une colonie hôte donnée. Lorsque les isolats viraux sont testés sur leurs hôtes d'origine, une adaptation de la population virale à la population d'insecte a été observée pour plusieurs couples hôte/pathogène: *Mamestra brassicae* (noctuelle du chou, Lepidoptera : Noctuidae), et son virus MabNPV [149], *S. frugiperda* et SfMNPV, *P. operculella* et PhopGV... Ce constat semble être une règle générale et se traduit au niveau génétique par la présence de génotypes spécifiques, ou par des différences dans leurs fréquences relatives. Si les différences en activité peuvent être souvent associées à la présence de marqueurs génétiques, pour l'instant l'observation de variations dans la séquence du génome ne permet pas de prédire une différence d'activité. Ces différences peuvent concerner leur pathogénicité (quantité nécessaire pour avoir une action sur une population), leur virulence (temps nécessaire pour observer cette action) [122], leur productivité ou d'autres caractéristiques [150].

La diversité génétique a donc un rôle important dans le cycle de vie des populations baculovirales dans la nature, mais cela ne veut pas dire que l'optimum naturel corresponde aux caractéristiques souhaitables pour une utilisation en contrôle biologique. Par exemple, les génotypes à forte virulence seraient les plus intéressants pour une utilisation comme insecticides biologiques, car ils vont tuer rapidement leurs hôtes. En revanche les génotypes qui tuent trop rapidement ne sont pas aussi intéressants pour des populations naturelles puisqu'ils tuent trop rapidement l'hôte et ne permettent pas une multiplication optimale pour le virus. L'optimum agronomique est donc opposé à l'optimum naturel de la population virale [151]. Une forte virulence est généralement un inconvénient puisqu'elle est associée à une faible productivité en OB.

I.6.4. Industrialisation des produits phytosanitaires

La connaissance acquise sur la diversité baculovirale n'était pas destinée à la lutte biologique, au contraire elle a servi à trouver « le meilleur génotype viral » pour l'utiliser de manière exclusive. Le passage d'une production artisanale des bio-insecticides à base de baculovirus à une production industrielle a impliqué la mise en place de procédures de standardisation du produit afin de garantir une qualité homogène au cours du temps. De plus, les autorisations de mise sur le marché imposent une description la plus précise possible de la composition. Ces aspects ont motivé l'utilisation préférentielle de clones viraux ou d'isolats à très faible variabilité pour l'industrialisation des produits.

L'utilisation d'un seul clone viral (homogénéité génétique) dans les préparations commerciales a suscité des questions sur leur durabilité, mais le consensus scientifique à l'époque supposait qu'il n'y aurait pas développement de résistances des insectes face à leurs propres virus. Depuis il a été constaté que la capacité des insectes à se défendre contre ce type d'infection a été sous-estimée.

I.7. Apparition de résistances spécifiques : une fatalité ?

La définition de la résistance donnée par l'IRAC (*Insecticide Research Action Comittee*) est la suivante : « La résistance peut être définie comme un changement héréditaire de la sensibilité d'une population d'organismes nuisibles qui se traduit par l'incapacité répétée d'un produit à atteindre le niveau de contrôle prévu lorsqu'il est utilisé conformément à la recommandation de l'étiquette pour cette espèce d'organismes nuisibles. Il y a résistance croisée lorsque la résistance à un insecticide confère une résistance à un autre insecticide, même lorsque l'insecte n'a pas été exposé à ce dernier produit. Il y a toujours un risque que la résistance aux insecticides évolue, surtout lorsque les insecticides sont mal ou trop utilisés » [152].

1.7.1. Résistances aux pesticides chimiques

Comme il est précisé dans la définition de l'IRAC, les résistances spécifiques n'apparaissent pas seulement suite à une évolution naturelle des interactions entre l'hôte et le parasite ; elles sont aussi le fruit d'une mauvaise pratique de l'utilisation des pesticides. Le premier cas signalé est celui de la mouche domestique en 1947, en Grèce, face au DDT (un organochloré) [153]. Depuis d'autres résistances spécifiques aux pesticides chimiques ont été recensées contre les organosphosphates, les carbamates les pyréthrinoides, les benzoyl-urées, les phénylpyrazoles, les néonicotinoides, les oxadiazines... [152] et ce nombre ne fait qu'augmenter chaque année (Figure 10).

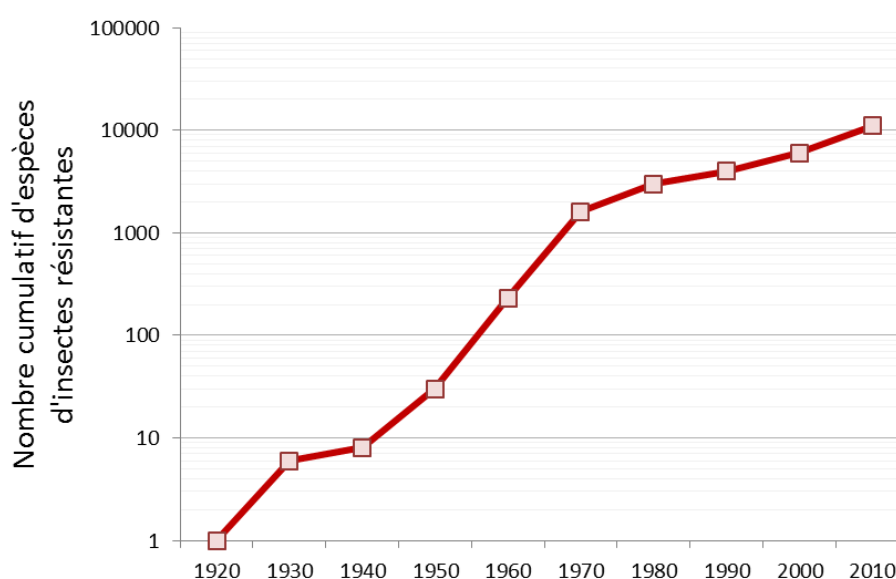


Figure 10 : Nombre cumulé d'espèces d'insectes résistantes aux insecticides de 1920 à 2010 [154].

Tous ces pesticides possèdent des modes d'action différents, qui vont provoquer une inhibition ou au contraire une sur-activation de cascades métaboliques au niveau du système nerveux (Figure 11), des muscles, de la croissance de l'insecte, ou de la respiration mitochondriale. Pourtant, des insectes vont développer des résistances contre ces pesticides. Ces résistances sont aussi variées que les modes d'action des pesticides.

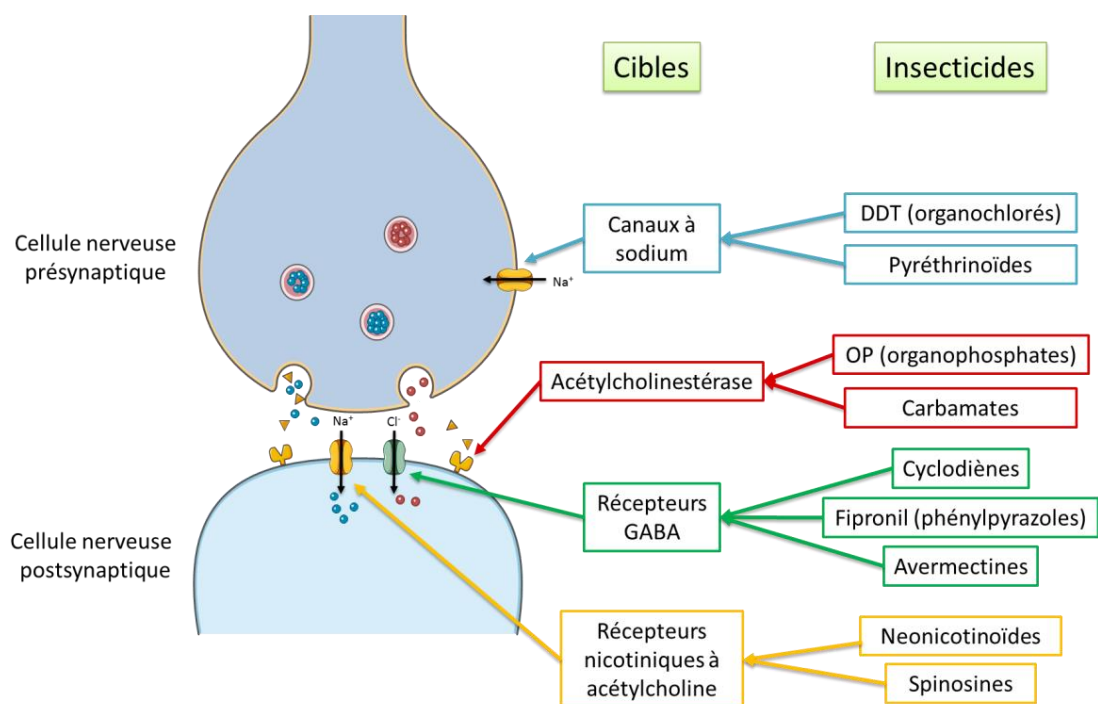


Figure 11 : Modes d'action des insecticides agissant sur le système nerveux de l'insecte. Image créée à l'aide de Servier Medical Art.

Les mécanismes de la résistance peuvent avoir plusieurs origines : ils peuvent être dus à un changement de comportement de l'hôte, aboutissant à réduire l'exposition de l'insecte au pesticide [155,156] ou ils peuvent aussi être d'origine physiologique [157]. Ces mécanismes peuvent être induits par :

- Une **mutation dans un gène cible** (enzyme ou récepteur) c'est le cas du site actif de l'enzyme acétylcholinestérase (AchE) [158,159], des canaux à sodium [160], du récepteur GABA [161–163] et des récepteurs nicotiniques à acétylcholine [164]
- Une **résistance métabolique** qui va permettre la détoxification (catabolisme ou séquestration des pesticides) grâce aux : monooxygénase cytochrome p450 [165,166], estérase [167], glutathione-S-transférase [168], etc.

I.7.2. Résistances aux biopesticides

I.7.2.1. Résistances à *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Les résistances ne se limitent pas aux pesticides de synthèse. *Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie GRAM positive utilisée comme bioinsecticide en culture maraîchère, vergers, vignes et en forêts depuis les années 60 aux États-Unis et 70 en France [169]. En 2016, ce bioinsecticide représentait 70% du marché des biopesticides dans le monde. La bactérie Bt produit des toxines, parmi elles les toxines CRY

(355 différentes répertoriées [170]) qui possèdent un effet larvicide [171,172]. Des résistances face aux toxines de Bt purifiées ont été relevées sur 5 ravageurs de cultures : *Helicoverpa zea* (maïs), *S. frugiperda* (maïs), *Busseola fusca* (maïs), *Pectinophora gossypiella* (coton) and *Diabrotica virgifera* (maïs) [173].

I.7.2.2. Résistances aux baculovirus

L'utilisation répétée d'un même génotype en lutte biologique soumet les populations d'insectes à des pressions de sélection similaires à celles des insecticides chimiques. Par conséquent, elle est susceptible de conduire à l'émergence de résistances spécifiques. Deux types d'études ont été menés pour évaluer ce risque. Premièrement, l'analyse de populations naturelles d'insectes pour chercher des cas de résistance ou de susceptibilité réduite, puis des études sur la génétique sous-jacente [174]. Deuxièmement, des essais de sélection ont été effectués en laboratoire sur plusieurs générations d'insectes. Une liste non exhaustive de ces résistances est donnée dans le [Tableau 2](#). Certaines de ces études, comme par exemple pour une colonie de *M. brassicae*, au cours de 25 passages successifs, ont montré une stabilité de l'efficacité du MbNPV au cours des générations [175] ; c'est aussi le cas de *Heliothis virescens* (noctuelle des bourgeons du tabac) qui après 15 générations n'a pas développé de résistance face à HzSNPV [176]. Par contre, dans d'autres cas, des résistances ont pu être mises en évidence, chez la teigne de la pomme de terre, *P. operculella* face au PhopGV [136], ou chez la chenille du pois mascate, *Anticarsia gemmatilis*, face au AgMNPV [177].

Ce n'est qu'à partir de 2005 qu'une résistance à un baculovirus utilisé de façon commerciale est observée en champ. Il s'agit du carpocapse des pommes, *Cydia pomonella*, et des produits à base du CpGV-M, isolat provenant du Mexique [178,179]. Cette résistance s'est progressivement étendue à toute l'Europe [180]. Cette résistance a motivé des recherches sur la variabilité génétique chez le CpGV. Rapidement, il a été possible d'obtenir des génotypes viraux capables de contourner la résistance à partir d'autres isolats : CpGV-E2 [131], CpGV-I07 [181], CpGV-I12 [182], CpGV-S [183] ou CpGV-R1, puis par sélection CpGV-R5 [184]. Cette résistance est spécifique pour un groupe de génotypes viraux très proches, dont celui qui compose l'isolat CpGV-M, mais ne bloque pas la réplication d'autres génotypes un peu plus éloignés. Ces analyses ont conduit à l'établissement de cinq groupes de génotypes viraux (groupes A à E) [185].

Tableau 2 : Résistances d'arthropodes spécifiques aux baculovirus décrites dans la littérature. Liste non exhaustive.

Virus	Arthropodes cibles ayant développés une résistance	Cultures impactées	Territoires où la résistance a été décrite	Références
AcMNPV	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	Coton	Laboratoire	[186]
AdhoNPV	<i>Adoxophyes honmai</i> (Lepidoptera : Tortricidae)	Thé	Laboratoire	[187]
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	Grandes cultures	Laboratoire	[177]
BmNPV	<i>Bombyx Mori</i> (Lepidoptera : Bombycidae)	Sériculture	Laboratoire	[188–190]
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera : Tortricidae)	Verger (pomme)	Naturelles (Europe)	[180,184,191]
LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i> (Lepidoptera : Lymantriidae)	Forêts de feuillus	Laboratoire	[192]
PbGV	<i>Pieris brassicae</i> (Lepidoptera : Pieridae)	Chou	Laboratoire	[193]
PhopGV	<i>Phthorimaea operculella</i> (Lepidoptera : Gelechiidae)	Pomme de terre	Naturelles (Australie)	[136]
PiGV	<i>Plodia interpunctella</i> (Lepidoptera : Pyralidae)	Fruit secs	Laboratoire	[194]
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	Maïs	Laboratoire Naturelles (Louisiane)	[195] [196]
SpexNPV	<i>Spodoptera exempta</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	Cultures céréalières	Laboratoire	[197]
TnSNPV	<i>Trichoplusia ni</i> (Lepidoptera : Noctuidae)	Plantes sauvages et cultivées	Laboratoire	[198]
Résistance croisée entre PrGV et TnGV				

Les mécanismes de défense des insectes contre les agressions par des pathogènes sont différents de ceux des mammifères et moins bien étudiées. Les insectes n'ont pas d'anticorps mais des systèmes de défense qui sont présents au niveau humoral (dans leur hémolymphe) [199] et au niveau de chaque cellule. La morphologie et la physiologie des insectes leur confèrent une protection contre les microorganismes présents dans l'environnement, on parle de protection physique conférée par la cuticule, la membrane péritrophique ou de protection chimique comme le pH très basique de l'intestin [109,200–202]. Il a été montré que chez certaines espèces comme *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae), le pH de l'intestin peut varier [203]. La défense immunitaire comprend de multiples voies de signalisation immunitaires innées (par exemple TOLL, IMD, JAK/STAT, JNK) qui pour certaines vont aussi jouer un rôle antiviral [204,205]. Parmi ces voies, les ARNi (ARN interférent) jouent des rôles multiples, comme la régulation des gènes qui contrôlent la croissance et la différenciation cellulaire [206–209], et la

protection antivirale [204]. La fonction antivirale est médiée par la protéine DICER (clivage dans le cytoplasme) qui clive les ARN exogènes (viraux) entraînant leur dégradation en petits fragments d'une vingtaine de nucléotides. Une stimulation du système immunitaire peut activer une réponse cellulaire (phagocytose, nodulation, encapsidation, apoptose [210,211]) et une réponse humorale (mélánisation et cascade phénoloxidase [192,197,212], ou l'induction d'hormones [213]), ou des changements au niveau des génomes, comme celui dans la structure secondaire du promoteur de l'actine de *Bombyx mori* (pA3) qui joue un rôle dans la résistance face à BmMNPV [190].

En général, les résistances ont un coût de mise en place pour l'insecte [214] : temps de développement plus long des stades larvaires et nymphaux [215], diminution du poids des nymphes [216], diminution de la fécondité des femelles [215], pré-oviposition longue. Ce coût de mise en place peut expliquer pourquoi les ravageurs ne développent pas facilement de résistance. De plus, des études théoriques indiquent que même si il y a propagation de la résistance, il y aura un retour à un équilibre entre les populations d'insectes et de virus [57,217]. Au niveau génétique, pour la résistance de *P. operculella* face au PhopGV [136], l'analyse a montré qu'il s'agissait d'une résistance monogénique dominante autosomale [174]. Cette résistance semble avoir un coût [218]. Chez *A. gemmatilis*, la résistance au AgMNPV a un coût sélectif important [177], ce qui conduit à une réversion rapide en absence de pression virale [219].

Dans le cas de la résistance du carpocapse à l'isolat CpGV-M, celle-ci est due majoritairement à l'action d'un gène majeur, localisé dans le chromosome sexuel de l'insecte [191], même si l'action d'autres gènes a été démontrée [220]. À ce jour, les mécanismes impliqués dans cette résistance n'ont pas été décrits ; la seule indication est qu'elle n'est pas liée au passage de la membrane péritrophique mais au blocage de la réplication virale dans l'ensemble des cellules de l'insecte [201]. Les analyses du coût biologique n'ont permis de déceler aucun désavantage sélectif pour les insectes résistants au CpGV-M [221]. De même, aucun coût n'a été détecté pour les isolats viraux capables de contourner la résistance [222].

Pour réduire ou retarder l'apparition de résistances, des programmes comme l'IRM (*Insect Resistance Management*) [223] ont été mis en place. Ils sont composés de plusieurs plans d'action tels que la surveillance de l'apparition de résistance ou la gestion des doses de biopesticides afin d'éviter d'éliminer les individus sensibles ce qui favoriserai les individus résistants [224]. Ces plans d'action préconisent aussi la diversification de moyens de lutte, tels que les pièges à phéromones [225], ou l'utilisation de parasitoïdes [226].

Malgré le développement d'isolats viraux monoclonaux capables de contrôler les résistances (qui peuvent être utilisé comme alternative), la question de leurs durabilités se pose : les insectes ne vont-ils pas développer des résistances contre ces nouveaux génotypes ?

II. LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *CYDIA POMONELLA*

II.1. Ravageur *Cydia pomonella*

La production mondiale de pommes représentait environ 5×10^6 hectares (2^{ème} fruit le plus produit en masse dans le monde) et celle des poires $1,38 \times 10^6$ hectares (6^{ème} fruit le plus produits en masse dans le monde) en 2018 [227]. Le carpocapse de la pomme (Cp ou *Cydia pomonella*) (Figure 12) est le ravageur le plus important de ces cultures [228], pouvant entraîner des pertes de 80% [229]. Les fruits infestés par le carpocapse sont considérés comme impropres à la consommation et ne peuvent être utilisés dans le meilleur des cas que pour la production de jus de fruits ou de compote.

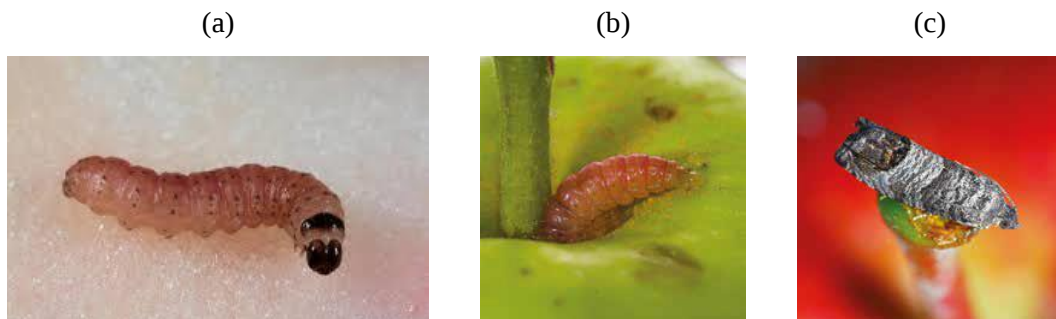


Figure 12 : Photographies de *Cydia pomonella* (a) au stade larvaire (L5) (b) pénétrant dans le fruit (c) au stade adulte [230].

Ce ravageur est probablement originaire d'Asie Mineure. Celui-ci a ensuite colonisé l'Amérique, au moment de l'importation de la culture du pommier [229]. Aujourd'hui, le carpocapse des pommes et des poires est répandu sur l'ensemble des territoires de culture du pommier (Figure 13).

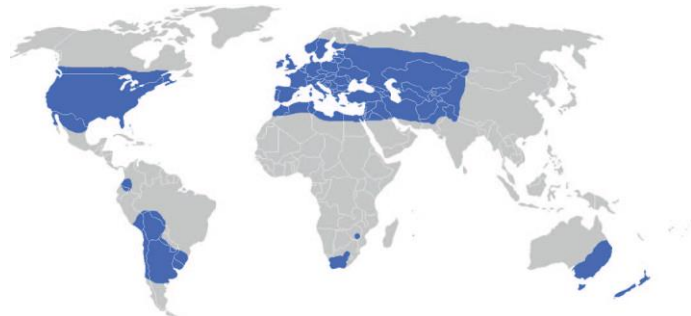


Figure 13 : Répartition géographique de *Cydia pomonella* dans le monde [231].

C. pomonella est un lépidoptère polyvoltin, dont le cycle de vie (Figure 14) dépend fortement de la température extérieure. Dans les pays tempérés, la première génération d'insecte apparaît entre mai et juin [232], les larves ayant passé l'hiver en diapause se transforment en pupes et les premiers adultes apparaissent au moment de la floraison du pommier. Les adultes s'accouplent et les femelles pondent leurs œufs sur les feuilles. Une fois les œufs éclos (environ 5 jours), les larves cherchent les fruits, y pénètrent en général au niveau du pédoncule et creusent jusqu'aux pépins pour se nourrir. Lorsque la larve est à l'intérieur du fruit, elle est protégée d'éventuels agresseurs ou des traitements phytosanitaires. Après 3 semaines les larves sortent pour former leur cocon dans l'écorce ou au sol (14 à 20 jours). La deuxième génération d'adulte apparaît aux alentours du mois de juillet. Chaque année, il y a 1 à 4 générations d'insectes, en fonction du climat local. À l'automne, les larves de stade 5 se préparent à diapauser pour l'année suivante.

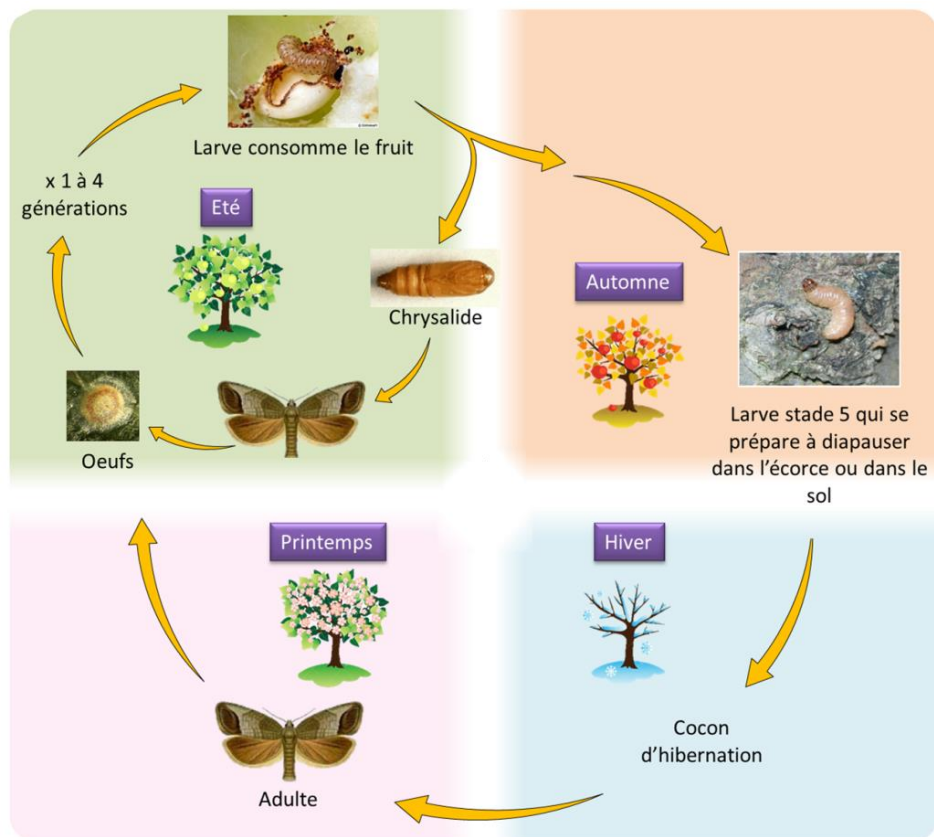


Figure 14 : Cycle de vie de *Cydia pomonella*.

II.2. Moyens de lutte existants contre *Cydia pomonella*

Pour lutter contre le ravageur *C. pomonella*, plusieurs méthodes sont à disposition : des méthodes de protection :

- Les protections physiques : utilisation de filets permettant de bloquer l'accès au ravageur.
- Les protections culturelles : consistent à adapter ces méthodes de culture, par exemple changer de variété, ajouter une haie de cyprès...
- Les pesticides chimiques : utilisation de 35 traitements en moyenne par an pendant toute la durée de vie de la culture [233].
- Les agents phytosanitaires : utilisation de piège à phéromone, confusion sexuelle (saturation de l'air en phéromones pour empêcher les mâles de localiser les femelles et ainsi limiter les accouplements), utilisation de parasitoïdes (*Hyssopus pallidus* Askew, *Trichogramma minulum* ou *Mastrus Ridens*).
- Les protections biologiques : (Bt, *Bacillus thuringiensis*), CpGV (*Cydia pomonella* granulovirus).

II.3. CpGV vs *Cydia pomonella*

Parmi les moyens de lutte biologique existants, le CpGV est utilisé pour contrôler le carpocapse des pommes et des poires, *Cydia pomonella* (Cp) (Figure 15). La lutte contre Cp en utilisant ces virus s'est rapidement répandue dès la découverte et la caractérisation du premier isolat, au Mexique, CpGV-M [234]. Des bioinsecticides basés sur l'isolat du CpGV-M ont été homologués à partir des années 1990 en Europe [235]. Les produits à base de CpGV sont l'un des moyens de lutte biologique les plus efficaces (DL₅₀ entre 1,2 et 5 granules) contre le carpocapse [235]. En Europe, le CpGV est appliqué chaque année sur plus de 100 000 hectares cultivés produisant des fruits à pépins (pulvérisé à 10¹³ OB.litre⁻¹.ha⁻¹) [236].

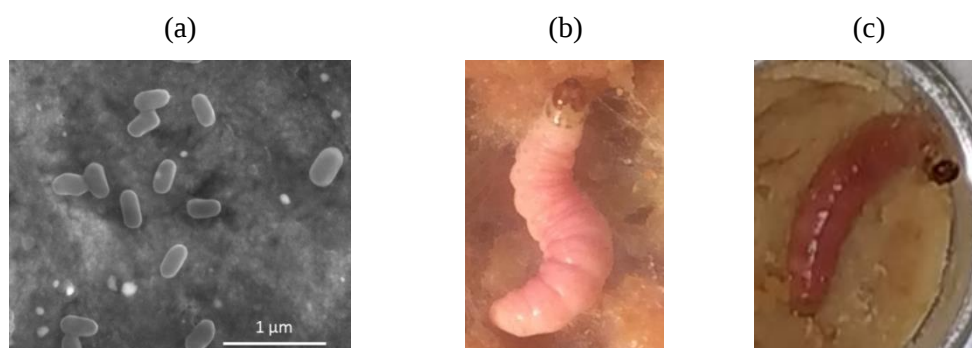


Figure 15 : (a) Image du CpGV obtenue par microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE). (b) Larve L5 infectée atteinte de granulose. (c) Larve L5 non infectée.

Le premier produit à base de CpGV, le Madex[®], a été enregistré et introduit sur le marché par Andermatt-Biocontrol en 1988 [237]. Le CpGV est utilisé sous sa forme d'OB. Aujourd'hui, il existe d'autres produits CpGV sur le marché européen : Carpovirusine[®] (Arysta LifeScience) et Cyd-X[®] (Certis). Les pesticides dérivés du CpGV étaient homologués dans 34 pays du monde en 2014 [183].

Cependant, après 20 ans d'utilisation dans la protection des pommeraies, en 2005 des insectes résistants au CpGV-M ont été détectés en Allemagne [178] et en France [179]. Cette résistance s'est répandue dans toute l'Europe [180]. Très rapidement, il a été possible de trouver des isolats viraux capables de se répliquer et de contrôler ces insectes résistants, par exemple le CpGV-R5 [181,182,184]. Une classification des génotypes CpGV en quatre types (A à D) a été proposée [238], CpGV-M appartenant au type A. Un cinquième type (E) a été proposé plus tard [239]. Tous ces isolats se caractérisent par la présence d'une modification de l'ORF24 (gène *pe38*) qui est associée à la capacité des isolats de virus à se répliquer chez les insectes porteurs de cette résistance [183].

Récemment, des résistances à d'autres groupes génétiques de CpGV ont été trouvées ; on parle désormais de résistance de type I (lié au chromosome Z et spécifique du groupe A), de type II (résistance autosomale contre les génotypes de A à E excepté le groupe B) [240] ou de type III (résistance spécifique à A et E et méthode de transmission différente des types I et II) [185]. Chez les insectes résistants de type I, la réplication du CpGV-M est bloquée à un stade précoce dans toutes les cellules [201], tandis que les autres isolats se répliquent mais pas tous avec la même efficacité [241]. Il semble y avoir des points de blocage spécifiques pour chaque génotype viral, et apparemment à coût faible, voire nul pour l'insecte. L'hypothèse de voies multiples de passage a été proposée [222]. Celle-ci suggère que les résistances spécifiques développées par les insectes bloquent un unique chemin, mais d'autres possibilités d'infection existent. L'emprunt d'un autre chemin est donc accessible à la population virale, si elle a les génotypes appropriés.

De nouveaux produits de biocontrôle à base de CpGV sont commercialisés aujourd'hui. Certains sont basés exclusivement sur l'isolat CpGV-M, tandis que d'autres, efficaces à la fois contre les insectes porteurs de la résistance de type I et les insectes sensibles [241], sont composés de mélanges de génotypes de virus appartenant à des groupes différents (Tableau 3). La Carpovirusine Evo2 (mélange des génotypes B et E) est à différencier du génotype R5 (génotype du groupe E obtenu en laboratoire capable de contourner la résistance de type I).

Tableau 3 : Groupes génétiques de CpGV des différents produits commerciaux et isolats auxquels ils correspondent. La carpovirusine Evo2 (mélange de A et E) est à différencier du génotype CpGV-R5 (E pur) utilisé dans le reste de ce manuscrit. Inspiré de [242] et de [241].

Produits commerciaux	Isolats	Groupes Génétiques CpGV				
		A (Bloqué par la résistance de type I)	B (Surmonte résistance de type I et II)	C	D	E
				(Surmonte résistance de type I)		
Carpovirusine® 2000	CpGV-M	100%				
Madex®	CpGV-M	100%				
Carpovirusine® Evo2	CpGV-R5	36%				64%
Madex® Max	CpGV-0006	36%				64%
Madex® Pro	CpGV-V15		49%			51%

Il est important de mettre en place une nouvelle stratégie de management contre Cp. En effet l'utilisation d'un produit unique risque d'engendrer l'apparition de nouvelles résistances.

Il a été démontré que l'efficacité des mélanges de CpGV-R5 et CpGV-M est plus élevée que celle d'un isolat seul pour le contrôle du carpocapse, même chez les individus résistants de type I [243]. L'utilisation d'une diversité génétique comparable à celle des populations naturelles en agronomie pourrait donc être bénéfique. Plutôt que d'alterner les différents traitements à base de baculovirus, nous proposons de les diversifier, avec la composition génétique la plus adaptée en fonction des populations d'insecte présentes. En ce qui concerne la population d'insectes, plus elle a une diversité génétique importante plus la probabilité qu'elle développe une résistance est importante.

De façon complémentaire, plus la diversité génétique des populations virales est importante, plus il sera difficile pour l'hôte de trouver des points de blocage à l'ensemble de la population virale.

III. NOUVELLE ÈRE DE BIOPESTICIDES : POURQUOI ET COMMENT PRENDRE AVANTAGE DE L'INFECTION MULTIPLE

On parle d'infection multiple lorsqu'il existe une diversité virale au sein d'un même hôte (à différencier d'une coinfection qui est l'infection d'une seule cellule par différents virus). Une infection multiple va s'établir de manière différente en fonction de la stratégie d'infection. Celle-ci est favorisée chez les NPV de par leurs structures (occlusion multiple). Dans ce cas, s'il y a une diversité de génotypes dans un seul OB, l'ingestion d'un seul OB est suffisante. On trouve également des infections multiples

chez les GV (occlusion simple) [181]. Cela nécessite en principe l'ingestion et le succès d'infection de plusieurs OB, eux-mêmes de géotypes différents, à moins qu'elle ne soit le résultat de l'infection par de rares OB co-occlus.

III.1. Co-enveloppement

Le co-enveloppement confère aussi un avantage lors de l'infection primaire du baculovirus. Chez les MNPV, un phénomène dit « d'effet de passage » peut être observé (Figure 16) ; durant celui-ci certaines nucléocapsides ne migrent pas jusqu'au noyau mais traversent les cellules intestinales sans réplication de leur génome. Ce passage dure seulement de 30 minutes à 1h [84], tandis que la réplication virale demande entre 8 et 12 heures [75,79]. (Figure 16). Washburn *et al.* ont démontré que l'encapsidation multiple chez AcMNPV permet d'accélérer l'infection secondaire [86], probablement grâce à l'effet de passage.

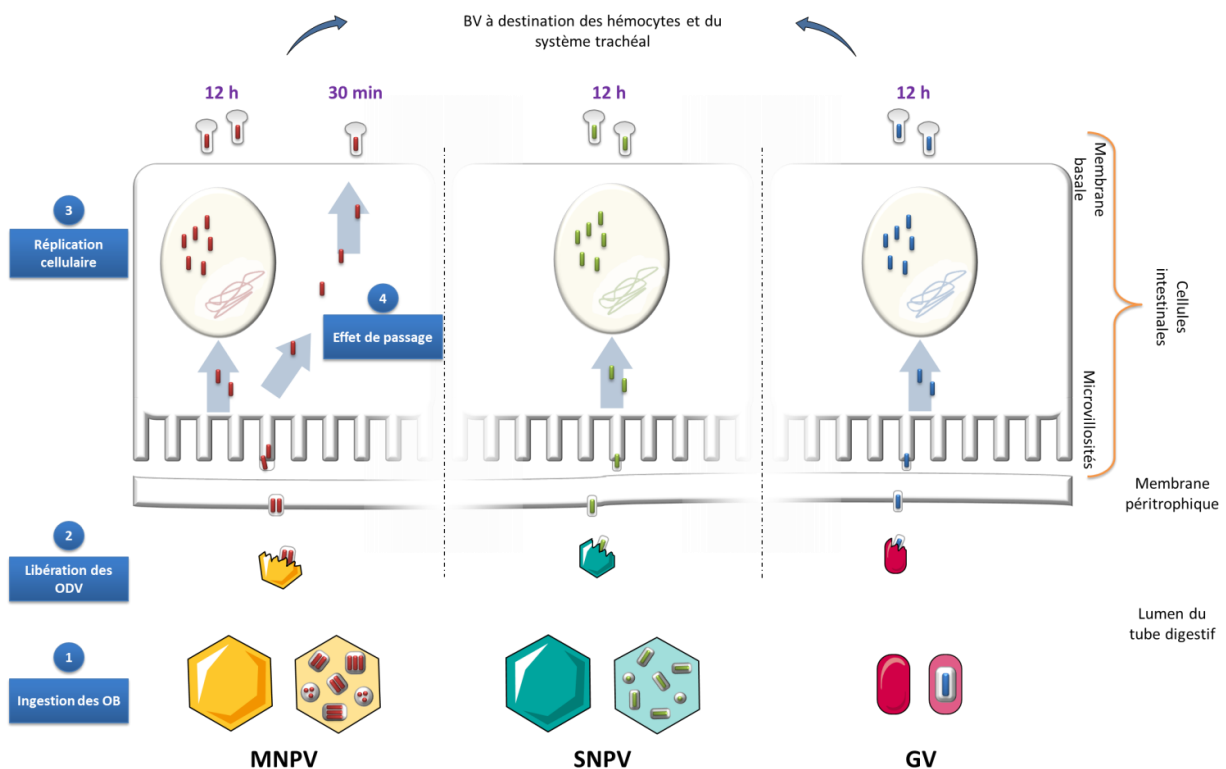


Figure 16 : Infection primaire chez les baculovirus: (a) par MNPV avec effet de passage, l'initiation de l'infection secondaire peut débiter à partir de 30 min (b) par SNPV (c) par GV.

III.2. Infection multiple : interaction neutre, compétitive ou bénéfique ? Le cas d'étude de PhopGV

En cas de présence de plusieurs génotypes viraux ou de plusieurs virus d'espèces différentes dans le même hôte, il peut y avoir différents types d'interactions. Des interactions de type parasitaire ont été décrites chez des populations de SeMNPV dans un produit commercial pour le contrôle de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae). La présence d'un génotype viral réduit la multiplication des autres à son profit, et réduit aussi la pathogénicité globale [244]. Peu de cas comme celui-ci ont été décrits. D'autres études au contraire ont montré que des interactions entre génotypes sont bénéfiques pour l'ensemble. Alizon *et al* soutiennent que ces interactions virales, qui ont lieu à l'intérieur de l'hôte, déterminent des caractéristiques telles que la virulence [245]. Dans les populations de PhopGV, la pathogénicité de différents isolats a été comparée pour le contrôle de deux ravageurs de la pomme de terre, *P. operculella* et *T. solanivora*. Certains de ces isolats ont montré une meilleure efficacité (VG001 et VG005) que d'autres (VG003). Il s'est avéré que les isolats VG001 et VG005 sont tous deux des mélanges de plusieurs génotypes. Dans une autre étude, l'efficacité de VG003 a été comparée lorsqu'il est combiné avec un isolat du Pérou (les deux peuvent être retrouvés dans une même population d'hôte). Au cours des différentes générations virales, les différents génotypes semblent se transmettre et être plus efficaces ensemble que seuls sur les deux populations d'insectes. De plus, ces mélanges peuvent changer d'hôte entre *P. operculella* et *T. solanivora* au cours des générations et préserver leurs efficacités. Les deux génotypes sont donc conservés et n'évoluent pas vers un génotype « hybride », mais vers une association de génotypes. C'est la diversité des génotypes qui permet la meilleure efficacité dans les deux hôtes [246,247].

III.3. Contournement de la résistance : Le cas d'étude de CpGV

Le succès de la colonisation d'un hôte par un (micro)organisme, tel qu'une infection virale, dépend de la capacité de ce parasite à traverser ou contourner toutes les barrières que l'hôte lui présente. Si une combinaison génétique particulière de ce (micro)organisme arrive à franchir ces barrières, elle conférera un avantage sélectif, et sera favorisée ; sa fréquence augmentera au cours des générations de l'hôte. Cette combinaison est spécifique à un hôte en particulier, et, lorsqu'il y a diversité des hôtes, favorise le maintien du polymorphisme du parasite [248,249]. La pression de sélection des différents génotypes va contribuer à maintenir, ou non, les génotypes et réguler finement la fréquence de chacun d'entre eux [120]. D'après Franck [250], il est toujours nécessaire que le mélange génotypique confère un avantage. Dans le cas d'infections multiples, si une larve est résistante à un génotype donné, mais pas aux autres, la probabilité qu'elle puisse survivre, est réduite.

La colonie de laboratoire R_{GV} de *C. pomonella* est résistante au CpGV-M. Le virus n'arrive pas à se répliquer dans aucune cellule de l'insecte. Récemment, nous avons observé qu'en présence de CpGV-R5,

l'infection par CpGV-M est possible [243] lors d'une infection *per os*. La probabilité d'une coinfection des cellules intestinales par les deux génotypes est très faible. Ceci suggère qu'il y aurait possibilité d'un effet « helper » à distance, c'est-à-dire, que la présence de CpGV-R5 rend les cellules de l'hôte permissives au CpGV-M. Alternativement, il faudrait que l'entrée dans les cellules ne soit pas aléatoire, mais que les deux virus rentrent ensemble, ce qui impliquerait l'existence d'un signal entre les génotypes. Il a également été observé qu'en plus de permettre la réplication de CpGV-M sur des insectes résistants, l'efficacité de la population virale augmente en conditions de laboratoire [243]. Il n'y a pas de données concernant les associations d'autres génotypes face aux résistances nouvellement décrites [185].

III.4. Infections multiples virales, la stratégie des populations naturelles : Le cas d'étude de SfMNPV

La caractérisation biologique et génétique de la population SfMNPV collectée au Nicaragua (Sf-NIC) a commencé à partir de 1999 [147]. Neuf génotypes (SfNIC-A à SfNIC-I) la composant ont pu être clonés en culture cellulaire. Au sein de la population, chaque génotype est présent avec une fréquence caractéristique. Des paramètres d'activités biologiques de chacun ont été comparés individuellement, tels que la virulence ou la productivité. Il est apparu que les propriétés biologiques de la population ne correspondaient pas à la combinaison linéaire des propriétés de chaque génotype présent, en d'autres termes, qu'il y a une complémentarité entre certains génotypes [251–253]. Certains de ces génotypes seuls (SfNIC-C et SfNIC-D) ne sont pas capables d'induire une quelconque mortalité *per os* [252], et d'autres au contraire tuent très rapidement. Aucun génotype isolé n'est aussi efficace que la population avec toute sa diversité. Lorsqu'on construit une population expérimentale constituée de SfNIC-C et un des génotypes à réplication autonome (par exemple le SfNIC-B), l'efficacité de la population est restaurée. Les mécanismes impliqués dans cette synergie ont été analysés. Lors de modifications des fréquences des génotypes dans des populations expérimentales de SfMNPV, ces fréquences reviennent à l'optimum naturel au cours des cycles d'infection [254]. La diversité génétique est maintenue au sein des populations de baculovirus, et la fréquence de certains génotypes est régulée finement pour optimiser la survie de cette population. De plus, la fréquence de chacun dans la population s'équilibre naturellement garantissant la meilleure efficacité et le maintien de la diversité.

Des larves ont été infectées avec un mélange de génotypes ayant des vitesses d'action différentes. Les cadavres ont été récoltés à différents temps (précoce/moyen/tardif) et la proportion de chaque génotype analysée. La composition génotypique de la descendance virale est la même, indépendamment du moment où la larve est morte. La population au complet est transmise tout au long du cycle indépendamment de l'infectivité individuelle de chaque génotype parent (capacité de tuer rapidement ou lentement). Les populations de SfMNV-NIC semblent adopter une stratégie de disponibilité de la totalité des génotypes afin de garantir un inoculum infectieux toujours frais pour la génération d'insectes

suivante. Il s'agit d'une stratégie intéressante pour infecter des insectes polyvoltins (plusieurs générations/an) et ainsi maximiser le succès collectif.

Dans ce modèle, la stratégie de tuer rapidement l'hôte ne semble pas toujours être la meilleure pour la survie du virus. Dans les populations de SfMNV-NIC, les génotypes qui tuent lentement sont maintenus. Dans le cas d'une infection multiple, chaque génotype semble se spécialiser afin de prévenir toute atteinte à la survie de l'ensemble, d'où l'importance de la diversité virale.

Dans le modèle *S. exigua* et SeMNPV, il a été démontré que certains génotypes de SeMNPV sont spécialisés dans une transmission verticale, ce qui facilite la survie du virus pendant l'hiver, ou lors des migrations des insectes adultes [255]. Il n'y a pas de preuve que le génome complet du baculovirus soit intégré à celui de son hôte. Par contre il a été observé l'intégration de certains gènes. (williams 2017 256)

III.5. Infections multiples inter-espèces entre virus entomopathogènes

Les infections multiples inter-espèces ont été observées pour la première fois en 1956 par Vago en soumettant *Vanessa urticae* (Lepidoptera : *Aglais urticae*, Petite tortue) à un stress métabolique. Des signes de virose sont apparus, mettant en évidence plusieurs virus latents [256]. D'autres infections multiples ont été observées avec les iridovirus et densovirus dans la même cellule [67], ainsi que des mélanges densovirus, iridovirus et baculovirus [257,258].

Chez *Autographa californica* et *Trichoplusia ni*, la présence de cinq particules virales morphologiquement distinctes a été observée [259] : deux l'ont été dans les noyaux, dans la même cellule ; deux autres virus ont été observés dans le cytoplasme et une cinquième particule ressemblant à un désoxyribovirus cytoplasmique icosaédrique a aussi été observée dans quelques cellules. Ceci peut s'expliquer par le fait que stimuler avec un virus hétérologue peut induire l'activation d'un virus homologue dormant ; la présence d'un virus homologue peut aussi permettre la réplication d'un virus hétérologue qui seul n'aurait pas pu se répliquer.

D'autres infections multiples entre différents virus entomopathogènes à ADN ont été observées dans la même cellule, l'un dans le noyau (AcMNPV) et l'autre dans le cytoplasme (*Chilo iridescent virus*) [260], et d'autres impliquant des virus à ADN (baculovirus) et à ARN (CPV) [261].

Des interactions positives ont été décrites lors d'infections avec plusieurs espèces de baculovirus. Tanada (1956) a décrit la présence de trois virus dans *Pseudaletia unipuncta*, un GV, un NPV et un CPV. En 1956, il décrit l'association en synergie entre le GV et le NPV. Le GV agit comme « helper » lors du passage de la barrière intestinale pour le NPV. De même, il a été montré que des protéines du granulovirus *Xestia c-nigrum granulovirus* augmentent l'infectivité de MabNPV contre les ravageurs *H. armigera*, *M. brassicae*, et *A. nigrisigna* [262]. Plus tard, il a été démontré que certaines protéines

présentes dans les OB et appelées enhancines, jouent un rôle de facilitation du passage de la membrane péritrophique [263]. L'efficacité de différentes combinaisons entre LdMNPV et HzMNPV, SeMNPV, SfMNPV a été comparée sur *H. zea*, *S. exigua* et *S. frugiperda* et la pathogénicité de ces combinaisons est supérieure à celle des virus seuls [264]. Ceci est probablement dû à la présence d'enhancines.

La présence de virus différents dans une même cellule pose la question de la possibilité de recombinaison entre ces virus. La capacité de recombinaison entre deux variants du même baculovirus est connue. Elle sert de base à la technologie des baculovirus recombinants. L'analyse phylogénétique des séquences suggère que certains gènes présents dans les baculovirus sont des mosaïques ou ont été acquis complètement d'autres virus. Ainsi, la polyédrine d'AcMNPV serait un assemblage de gènes d'autres baculovirus [265], et le gène *gp64* dans le groupe I des Alphabaculovirus a des homologues avec les protéines d'enveloppe d'un rétrotransposon [266] ou du virus [267]. La présence de transposons et leur mobilité entre les génomes de baculovirus et de l'insecte hôte a été bien documentée [268].

III.6. Vers un nouveau paradigme dans les bioinsecticides à base de baculovirus

Dans le cadre d'une utilisation agronomique des biopesticides à base de baculovirus, la composition optimale d'un produit est celle qui va permettre l'arrêt rapide des dégâts causés par les populations d'insecte, sans pour autant favoriser l'apparition de résistances. Ces deux objectifs peuvent ne pas être compatibles. Jusqu'à présent, l'objectif principal avait été le premier, mais le développement de résistances fait changer cette perspective, en s'inspirant du fonctionnement des populations virales dans la nature.

Dans les parties précédentes, nous avons montré l'importance de la diversité génétique dans les populations naturelles de baculovirus, et comment ces populations la perpétuent. Le maintien de cette diversité au niveau industriel et dans des conditions contrôlées pose plusieurs questions.

Il est possible d'obtenir des mélanges de génotypes qui reproduisent les proportions observées, ou celles voulues car montrant des caractéristiques agronomiques optimales. Cependant, un mélange de virus produit de façon indépendante n'est pas équivalent du point de vue biologique à une population génétiquement diverse issue de coinfection ; dans certains cas, le mélange est moins efficace que la population génétiquement diverse. *A contrario*, le contrôle des fréquences dans le second cas est largement plus difficile.

Dans une perspective temporelle et spatiale, la question des changements dans les fréquences des génotypes viraux dans le produit (afin d'optimiser l'adaptation aux populations d'insectes) soulève des questions industrielles et réglementaires : comment adapter en continu le produit fourni à chaque verger en fonction des insectes présents dans ce verger, et cela au cours du temps. Comment cela peut être mis

en pratique au niveau industriel ? Quel niveau de détail dans la description sera demandé au niveau réglementaire ?

Ces questions font le parallèle à celles posées en santé humaine, d'une médecine classique à une médecine personnalisée, avec le développement de systèmes de surveillance au niveau de l'individu, dite « *point of care* ».

Dans l'évolution des pratiques agronomiques pour la protection des cultures, la réduction souhaitée de l'utilisation des insecticides passe par de meilleures connaissances des équilibres qui s'établissent entre les insectes ravageurs et leurs systèmes de contrôle, prédateurs et parasites. Dans le cas des baculovirus, nous nous rendons compte de la complexité des relations avec leur hôte. Sous-estimées auparavant, leur meilleure compréhension permettrait un contrôle plus efficace.

IV. QUELS SONT LES VERROUS SCIENTIFIQUES À L'ÉTUDE DES INFECTIONS MULTIPLES CHEZ LES BACULOVIRUS ?

L'étude des infections multiples au sein d'une larve hôte, ou au sein d'une cellule hôte implique de pouvoir différencier facilement chacun des génotypes viraux, et de pouvoir suivre la colonisation et la réplication dans l'hôte. Deux grands types de techniques existent. Les premières sont les techniques basées sur l'observation du virus dans l'organisme ou les cellules, il s'agit des approches par histologie et microscopie. Les secondes sont celles basées sur la quantification des proportions de chaque génotype à l'issue de l'infection, c'est-à-dire, la comparaison de la composition des OBs produits par rapport à celle des OB utilisés comme inoculum. Chacune de ces approches a des avantages et des limites.

IV.1. Observation directe du virus par microscopie

La microscopie électronique à transmission (MET) permet de visualiser des particules jusqu'à une résolution de 0,1 nm. Cette technique permet par exemple de visualiser une infection cellulaire à un instant donné, mais elle ne permet pas le suivi d'une infection en temps réel. En effet, cette microscopie nécessite de préparer les échantillons au préalable, en les fixant. De plus, la microscopie électronique ne permet de différencier que des structures morphologiquement distinctes (comme par exemple les OB des NPV de ceux des GV). Ces approches ne sont pas appropriées pour analyser un grand nombre d'échantillons permettant d'avoir une représentation statistique de la population virale et de son évolution au cours du temps et dans l'espace.

IV.2. Détections des composants du virus

IV.2.1. Détection de protéines (immunomarquage)

L'immunomarquage consiste à détecter une protéine virale cible grâce à un anticorps qui lui est spécifique. Ces anticorps peuvent être couplés à un fluorochrome (immunofluorescence), couplé à une enzyme (test ELISA (*enzyme-linked immuno assay*)), ou couplé à des microparticules d'or (*immunogold*). Le désavantage principal de cette technique est le développement des anticorps qui implique des coûts importants. De plus, ce type de détection n'est efficace que si les espèces recherchées expriment des épitopes différents. La préparation des échantillons nécessite la perméabilisation des membranes, donc, la fixation, et comme dans le cas de la microscopie électronique, ne permettent pas un suivi au cours du temps.

IV.2.2. Détection d'acide nucléique (PCR)

La technique PCR (*polymerase chain reaction*) consiste à amplifier une zone d'intérêt dans le génome (amplicon) à l'aide d'amorces spécifiques de cette région. Les détails de la technique sont donnés dans le [Chapitre 4](#). Cette méthode a l'avantage d'être sensible et plus simple à mettre en place qu'une technique d'immunomarquage. Cette technique permet d'identifier différents génotypes d'une même espèce soit en utilisant des sondes pour chaque amplicon soit en les séquençant (équipement important et coûteux). Le désavantage de cette technique est qu'elle s'effectue sur l'individu en entier et ne permet pas de suivre l'infection *in vivo* à l'échelle de la cellule.

IV.3. Marquage de la cellule infectée

Les virus sont modifiés génétiquement par insertion du gène d'une protéine fluorescente (telle que la GFP) juxtaposé au gène de la protéine virale d'intérêt. Une fois l'infection initiée, les protéines recombinantes sont produites et relarguées dans le cytoplasme de la cellule infectée et peuvent être suivies par microscopie à fluorescence. L'intérêt de cette technique réside dans la possibilité de marquer chaque espèce virale avec un fluorochrome spécifique et permet donc le suivi d'infections multiples. L'inconvénient est que ce marquage ne permet pas de suivre les particules virales mais seulement de suivre les protéines hétérologues.

IV.4. État de l'art des outils utilisés pour la détection des génotypes de CpGV

Dans les études précédentes sur le modèle CpGV et *C. pomonella*, les différents génotypes ont été identifiés par une PCR suivie d'une électrophorèse ou par un séquençage [183,243] en exploitant la variabilité du gène *pe38* (impliqué dans la résistance de type I). Cette région présente une différence de 24 bp entre les génotypes capables de contourner la résistance ou non. Ce type d'approche technique est compliqué à mettre en place pour l'analyse en surveillance au niveau du verger. En effet l'approche par

électrophorèse aurait été fastidieuse et trop onéreuse pour analyser un grand nombre d'échantillon et le séquençage l'aurait été encore plus. Le deuxième inconvénient est que ces techniques ne permettent pas la quantification des génotypes dans les co-infections. En effet, dans des travaux précédents, lors d'une coinfection par CpGV, l'analyse des proportions de chaque génotype (CpGV-M et CpGV-R5) a été réalisée par analyse de l'intensité des fragments obtenus en gel d'électrophorèse. Cette approche ne permet qu'une quantification relative.

V. OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif ultime de cette thèse est de contribuer au développement d'une solution durable pour aider les producteurs de fruits à lutter contre *C. pomonella*. La stratégie proposée pour endiguer les résistances est d'utiliser les infections multiples, déjà présentes dans les populations naturelles, plutôt que de développer un isolat clonal. Ces infections multiples présentent plusieurs avantages : elles sont plus efficaces que des génotypes individuels, l'ensemble de ces génotypes permettent plusieurs stratégies d'infections différentes, permettant aussi le contournement de résistances, elles permettent de s'adapter en continu aux populations d'insectes. Ainsi en jouant sur la présence en continu de cette diversité pour permettre l'infection multiple on devrait garantir la durabilité des biopesticides à base de baculovirus.

Des objectifs opérationnels dans l'exploration de la diversité génétique dans les populations de CpGV ont été fixés :

1. Suivre l'infection de chaque génotype seul ou en coinfection.
2. Quantifier la fréquence relative de chaque génotype lors des coinfections dans un individu.
3. Quantifier la proportion d'insectes infectés par un ou par plusieurs génotypes en conditions de verger.

Pour étudier cette approche, il a été nécessaire de se doter des outils permettant de suivre les dynamiques des infections multiples de baculovirus aux trois niveaux : celui de la cellule, celui de l'organisme entier et enfin celui de la population.

Le premier outil (décrit dans le [Chapitre 3](#)), est une technique de marquage de l'ADN, la technologie ANCHORTM développée par l'entreprise NeoVirTech. Cette technologie marque chaque génotype par des protéines fluorescentes produites par le propre virus et permet de suivre les infections multiples à l'intérieur de l'hôte. La faisabilité de cette approche sur les baculovirus a été testée sur AcMNPV ([Chapitre 3](#), partie III), un baculovirus modèle pour lequel des cultures cellulaires et des outils biotechnologiques sont disponibles. Contrairement aux NPV, pour que des infections multiples chez un GV puissent se produire, il faut que l'insecte ingère plusieurs OB contenant des génotypes différents.

Nous avons adapté cette technologie pour visualiser la localisation et la réplication des génomes CpGV-M et CpGV-R5 rendus fluorescents ([Chapitre 3](#), partie [IV](#)).

Le deuxième outil est une qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) en temps réel suivi d'une analyse par HRM (*high resolution melting*) qui permet de a pour but de quantifier l'occurrence des infections multiples de génotypes voisins à l'échelle des populations et de l'individu en permettant une analyse automatisée et sur un grand nombre d'individus. En effet, la présence des deux génotypes sur un échantillon de plusieurs insectes, analysé globalement, n'implique pas que chaque insecte soit infecté par plusieurs génotypes. À cette fin, nous avons utilisé la HRM. Elle est basée sur la différence de taille du gène *pe38*, gène qui a été identifié comme un marqueur de la résistance de *C. pomonella* [183]. Cette différence de taille se traduit par une différence dans la température de fusion du fragment d'ADN correspondant. Ce gène est amplifié par qPCR suivi d'une fusion des amplicons et d'une analyse HRM. Cette partie du projet a été effectuée en collaboration avec l'école de l'ADN ([Chapitre 4](#)).

Le chapitre 5 concerne l'étude de la fréquence des doubles infections dans des conditions agronomiques rendue possible grâce aux développements de la méthode HRM exposée dans le [Chapitre 4](#). Dans un premier temps, des expériences de laboratoire ont été menées pour étudier la relation entre des paramètres d'inoculation et l'occurrence d'infections multiples. Une fois ces données acquises, ces analyses ont été effectuées dans des conditions agronomiques. Deux vergers de pommes à Lamotte-du-Rhône et Graveson (en collaboration avec l'INRA Avignon), qui utilisent deux méthodes distinctes de dispersion de produits de biocontrôle, ont été échantillonnés dans nos études. Une analyse de la dispersion des bioinsecticides dans les deux vergers a été réalisée par observation MEBE. Ensuite, des infections équivalentes à celle réalisées en laboratoire ont été réalisées avec des feuilles provenant des deux vergers. Dans les préparations commerciales (Carpovirusine[®] EVO2 et Madex[®] MAX), deux génotypes sont présents : un type A (CpGV-M) et un type E (CpGV-R5 ou CpGV-2016-r16). Ces travaux devraient permettre de déterminer le pourcentage de coinfection en verger (détermine la structuration dans les produits commercialisés, utilisé selon les préconisations à 10^{13} OB.ha⁻¹) ; mais aussi les variations dans cette coinfection en fonction de la dose appliquée, en utilisant l'approche HRM sur des larves infectées en laboratoire sur des feuilles traitées en champ ([Chapitre 5](#)).

L'outil HRM a été utilisé pour étudier le fonctionnement des infections multiples, et en particulier l'importance de l'ordre d'ingestion de chaque génotype CpGV-M et CpGV-R5 ([Chapitre 6](#), partie [II.1](#)) et si il existe un délai d'ingestion durant lequel la larve reste permissive à une 2^{ème} infection ([Chapitre 6](#), partie [II.2](#)).

Finalement, ont été étudiées les interactions lors d'une infection multiple entre deux espèces de baculovirus capables d'infecter *C. pomonella* : *Cryptophlebia peltastica* nucléopolyédrovirus (CrpeNPV, isolé et étudié à Rhodes University) et CpGV ([Chapitre 6](#), partie [III](#)).

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. MATÉRIELS

V.1.Colonie de *Cydia pomonella* sensible au virus CpGV-M : CpNPP

CpNPP est la colonie d'insecte de référence sensible au CpGV-M. Elle est originaire du Nord de la France, et est maintenue en laboratoire depuis près de 30 ans. Elle est utilisée pour la production industrielle de Carpovirusine[®], et a été fournie par Natural Plant Protection (Arysta LifeScience (Noguères, France) [243].

V.2.Colonie de *Cydia pomonella* résistante au virus CpGV-M : R_{GV}

La colonie d'insecte R_{GV} est résistante au virus CpGV-M. Cette colonie a été obtenue en laboratoire par croisement entre une colonie sensible (Sv) et des insectes résistants prélevés sur le terrain à Saint-Andiol (St-A) dans les Bouches-du-Rhône en France [179]. Les descendants de ces croisements ont été sélectionnés successivement à une dose discriminante afin d'éliminer les individus sensibles au virus. Le fond génétique de la colonie résistante a été estimé à 99,6% identique à celui de la colonie sensible [142]. Chaque année la colonie R_{GV} est resélectionnée afin de conserver un niveau de résistance suffisamment élevé. Cette résistance est caractérisée comme dominante et portée par le chromosome sexuel Z. Cette colonie reste sensible à d'autres isolats tels que CpGV-R5.

V.3. Population de *Spodoptera exigua*

Les œufs de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) ont été fournis par P. Caballero, de l'Universidad Pública de Navarra.



Figure 17 : *Spodoptera exigua* adulte [269].

V.4. Cellules

Des cellules de *S. frugiperda* 9 (Sf9) (ATCC # CRL1711) ont été utilisées pour l'amplification des différents clones d'*Autographa californica multiple nucléopolyédrovirus* (AcMNPV) [270].

V.5. Isolats viraux

CpGV-M est le premier isolat de CpGV, découvert au Mexique et décrit par Tanada en 1964 [234]. Son génome est de 123,5 kbp [271]. Le stock de laboratoire utilisé dans nos expériences est le #2020-s1.

L'isolat CpGV-R5 a été décrit précédemment [272]. La taille de son génome est de 123,1 kbp. Le stock #2016-r16 de cet isolat viral a été utilisé dans les expériences.

Le clone AcMNPV 1.2 a été fourni par le CNRS UPS3044 Baculovirus et thérapie (Numéro d'accès GenBank L22858.1) [117].

L'isolat *Cryptophlebia peltastica* nucléopolyédrovirus (CrpeNPV-SA) a été fourni par Caroline Knox de l'Université de Rhodes, Afrique du Sud. (Numéros d'accès GenBank MH394321) [273].

VI. MÉTHODES

VI.1. Élevages de *Cydia pomonella* et *Spodoptera exigua*

L'élevage de *Cydia pomonella* est gardé à une température de $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ avec une photopériode de 16 heures jour : 8 heures nuit et une hygrométrie de 60% ($\pm 10\%$). Les adultes sont élevés en volières cubiques d'environ 25 cm de côté (Figure 18a). À l'intérieur de ces volières se trouve un abreuvoir pour nourrir les insectes (mèche de coton dentaire imbibée d'eau sucrée) et une feuille de ponte (feuille de Parafilm®) pour récupérer les œufs. Ces feuilles de pontes sont récupérées deux fois par semaine et transférées dans des boîtes (Figure 18b). Après quelques jours (3-4 jours), une partie des larves néonates est déposée sur du milieu nutritif (farine de maïs, germe de blé, levure de bière, acide ascorbique, acide benzoïque, formaldéhyde, antibiotiques, antifongiques et agar-agar [274]) dans lequel les larves se développent jusqu'au stade adulte pendant un mois (Figure 18c). L'autre partie des néonates est utilisée pour les expériences.

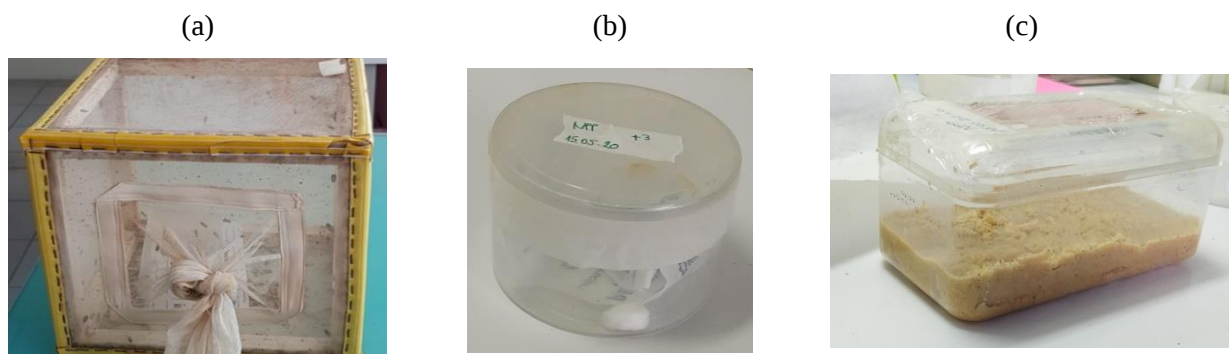


Figure 18 : Élevage de *Cydia pomonella* (a) volière qui contient les adultes, avec une feuille de ponte en son centre (b) boîte dans laquelle la feuille de ponte est transférée (c) boîte de milieu nutritif où les larves néonates sont déposées.

Les larves de *Spodoptera exigua* ont été élevées sur le milieu commercial (Stonefly Heliethis diet. Ward's Science Rochester NY, USA) dans les mêmes conditions que *Cydia pomonella*.

VI.2. Cultures cellulaires

Les cellules *Sf9* sont cultivées en utilisant les conditions précédemment publiées, à 28°C dans du milieu TC100 additionné de 5% de FBS, de 0,5% pénicilline-streptomycine et de 1% d'acide pluronique [270].

VI.3. Amplifications virales et production de stocks viraux

VI.3.1. Amplification *in vitro*

Une fois les co-transfection AcMNPV-ANCHOR réalisées (Chapitre 3), les virus recombinants AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1 obtenus ont été amplifiés sur cellule *Sf9* en culture agitée ($1,5 \times 10^6$ cellules.mL⁻¹).

L'amplification de BV est réalisée en 2 étapes : une première amplification, P1, 100 mL de cellules sont infectées avec 750 µL du surnageant de co-transfection, pour obtenir une concentration de 1 à 2×10^6 PFU.mL⁻¹. Une deuxième transfection, P2, 200 mL de cellules sont infectées avec une MOI (*multiplicity of infection*) comprise entre 0,1 et 1, pour obtenir un volume stock de 200 mL de virus à 1×10^9 PFU.mL⁻¹. Après 3 jours post infection, les BV sont récoltés et conservés à 4°C.

L'amplification des OB est réalisée en infectant les cellules avec une MOI entre 1 et 5 et en récoltant 3 à 4 jours post infection. Les surnageants sont centrifugés et les culots conservés à -20°C.

VI.3.2. Amplification *in vivo*

Les mêmes protocoles d'amplification virale *in vivo* sur *C. pomonella* ont été utilisés indépendamment du virus amplifié (CpGV ou CrpeNPV).

50 µL d'une suspension virale à une concentration de 800 OB.µL⁻¹ sont déposés en surface de plaques à 24 puits (P24) remplies d'environ 1 g de milieu (Stonefly Heliothis Diet, Ward's Science, Rochester, NY, États-Unis supplémenté avec 0,2% d'acide acétique). Des larves *Cydia pomonella* de troisième stade (L3, âgées de 7 jours) sont placées à la surface. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions abiotiques que celles de l'élevage.

Après 4 jours, les larves malades sont extraites du milieu et maintenues à 25°C un jour supplémentaire dans des microtubes de 1,5 mL. Les larves infectées sont ensuite écrasées dans de l'eau distillée. Ce mélange est filtré à travers un filtre de nylon pour éliminer les débris d'insectes, puis centrifugé 5 min à 8000 g. Le culot est récupéré et mis en suspension dans de l'eau distillée (1 mL pour 10 larves). Les stocks de virus finaux (concentration autour de 10¹¹ OB.mL⁻¹) sont conservés à -20°C [184,275].

La concentration approximative des amplifications de CpGV (Équation 1) est estimée par spectrophotométrie à 420 nm. Cette formule a été adaptée de celle utilisée pour *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) [276].

Équation 1 : Formule utilisée pour déterminer la concentration du CpGV (OB.µL⁻¹) par densité optique (DO)

$$[C] = \frac{DO_{420nm} \times dilution \times 2,6 \times 10^9}{0.8}$$

VI.4. Différentes catégories d'infection

VI.4.1. Infections in vitro

Les infections de cellules Sf9 (10⁶ cellule.mL⁻¹) ont été réalisées avec les virus recombinants : AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1 avec une MOI de 0,1 à 5.

VI.4.2. Infection per os de *Spodoptera exigua*

Le culot d'une culture cellulaire infectée par AcMNPV-ANCHOR (qui contient des OB) a été utilisé (à différentes dilutions) pour infecter des larves *Spodoptera exigua* de stade L3 en infestant le milieu nutritif.

VI.4.3. Infection per os de *Cydia pomonella*

VI.4.3.1. Infection de néonates

Les larves néonates (moins de 24 heures) ont été déposées sur une surface infestée (milieu Stonefly Heliothis ou feuille de verger) dans des boîtes de 20 cm² avec des concentrations virales variables. Lorsque l'expérience exigeait de maîtriser le temps d'infection, les larves étaient transférées du milieu

infesté, à l'aide d'un cure-dent, vers une autre boîte contenant du milieu propre. Ces boîtes étaient incubées 4 jp.i. dans les mêmes conditions abiotiques que celles de l'élevage, avant de récolter les larves.

VI.4.3.2. Infection de larves L3

Des larves *Cydia pomonella* de troisième stade (L3) sont placées à la surface du milieu infesté dans une P24 avec 50 µL d'une suspension virale à des concentrations variables. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions abiotiques que celles de l'élevage. Après 4 jours, les larves malades sont extraites du milieu et maintenues à 25°C un jour supplémentaire dans des microtubes de 1,5 mL. Les larves infectées sont ensuite écrasées dans de l'eau distillée.

VI.4.3.3. Infections avec des mélanges CpGV-M + CpGV-R5 et passages successifs

La quantité d'ADN viral des isolats 2020-s1 (CpGV-M) et 2016-r16 (CpGV-R5) a été déterminée par qPCR pour ajuster précisément les proportions relatives des deux génotypes. Chaque mélange a été identifié par les proportions relatives de chaque génotype, « M_i » et « R_j », i étant la fréquence de CpGV-M et j étant la fréquence de CpGV-R5 sur l'inoculum.

Tableau 4 : Mélanges CpGV-M et CpGV-R5 utilisés comme gamme standard et comme inoculum.

M_i et R_j	Proportion de CpGV-M (%)	Proportion de CpGV-R5 (%)
M99-R1	99	1
M95-R5	95	5
M90-R10	90	10
M75-R25	75	25
M50-R50	50	50
M25-R75	25	75
M10-R90	10	90
M5-R95	5	95
M1-R99	1	99

Les larves sont infectées individuellement par ces mélanges. La descendance de ces mélanges viraux a été analysée sur les différents phénotypes viraux (BV ou OB). Selon ce morphotype, le processus d'extraction des particules virales change.

Analyse de la production de BV : 72 heures après l'inoculation, les larves ont été lavées dans du SDS à 0,1 % et rincées deux fois dans de l'eau distillée. L'hémolymph de chaque larve a été récupérée individuellement avec une fine pipette Pasteur, représentée par H(M_i - R_j).

Analyse de la production d'OB : 4 jours après l'infection, les larves malades ont été prélevées et broyées collectivement, puis filtrées (même processus que la section VI.3.2). Les OB produits sur ces infections ont été nommés P(Mi-Rj).

La descendance de certains de ces mélanges est utilisée comme inoculum viral pour une ou plusieurs nouvelles générations d'insectes. Ces passages successifs ont été réalisés lors d'un contrat post doctoral par Benoit Graillot [277].

VI.5. PCR, qPCR et HRM

Le principe de la technique PCR est détaillé dans le Chapitre 4.

Les réactifs PCR ont été fournis par Solis BioDyne (Tartu, Estonie), voir Tableau 6. Ils ont été utilisés pour les projets suivants : virus recombinants ANCHORTM, identification des génotypes CpGV par HRM et les mécanismes impliqués dans les infections multiples.

Tableau 5 : Mix PCR, qPCR et HRM utilisés dans les différents projets

Application	Réactifs PCR
PCR	5x FIREPol [®] Master Mix with 12,5 mM MgCl ₂
qPCR	5x HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] qPCR Mix Plus (no ROX)
HRM	5x HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] HRM Mix (ROX)

Les amorces ont été conçues à l'aide de Clone manager V9 (logiciel SCI-ED, Denver, CO, USA) et ont été synthétisées par Eurofins MWG (Ebersberg, Allemagne). Les concentrations de chacune d'entre elles sont adaptées en fonction de leurs utilisations (PCR = 500 nM, qPCR = 500 nM, HRM = 200 nM).

Tableau 6 : Amorces utilisées au cours de chaque projet de recherche. La position indiquée sur les génomes est relative au génome CpGV-M. Tm correspond à la température de fusion de chaque amorce.

Nom	Position génom	Cible	Tm (°C)	Amplicon (bp)	Sens	Séquence
Construction CpGV ANCHOR						
CpGV_p1_F	94171	Région entre ORF112 et	72	1841	F	CCTGCAGGAATGAGGGTGTT GAGCAGAG
CpGV_p1_R	95955	ORF113 (contient le site <i>Sfi</i> I)	71		R	CCCGGGAATAAAATTTTTTTG TGTACACCGTTTATTTTTTAC AAAGTAC
CpGV_p2_F	95998	Région entre ORF112 et	70	784	F	CCTAGGTAGCCACCACAAC TATTATGGTTACAATGAG
CpGV_p2_R	96749	ORF113	67		R	CTTAAGGGTCTGATTCAATTC GACGGC
Projet ANCHOR : sélection des virus recombinants CpGV-ANCHOR						
A3_173_F	-	Gène A3	65	173	F	CTGATAGCGTGCGGTTACC
A3_173_R	-		66		R	GCGAATGCGCACTGTTCGAG
Projet identification des génotypes CpGV par HRM						
CpGV_18734F	18734	Gène <i>pe38</i>	58	121 (CpGV- M) ou	F	GCCACCATTAGTGAATCATC
CpGV_18855R	18855		61	97 (CpGV- R5)	R	TAAGTCAGGACACCCAAACC
Projet coinfection entre NPV et GV						
polh_CrpeNPV_F	117	<i>polyédrine</i>	61	342	F	CGAGCATGAAATCGAGGAAC
polh_CrpeNPV_F	458	CrpeNPV	61		R	ACTTCGTGAGGCACATAGTC

Les cycles d'amplification ont été adaptés selon les recommandations des fournisseurs pour l'activation de la polymérase : les températures d'appariement ont été adaptées en fonction de la séquence de chaque amorce et le temps d'élongation selon la taille des amplicons synthétisés. Le thermocycleur utilisé est le CFX96 Touch Real-Time Système de détection PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA [Figure 19a](#)) avec les plaques PCR Hard-Shell® 96 puits, blanches à fonds transparents. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel « Biorad CFX maestro™ » pour l'interprétation de la qPCR et de « Precision Melt Analysis™ » pour l'analyse des résultats HRM (Bio-Rad Laboratories). Les amplicons PCR ont été séquencés par EurofinsMWG (Ebersberg, Allemagne). Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide de Clone manager V9 (logiciel SCI-ED).



Figure 19 : Thermocycleur utilisé dans les différents projets de recherche : CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System de BioRad® [278].

VI.6. Microscopie

VI.6.1. Microscopie à fluorescence

La sélection des larves infectées par du virus recombinant CpGV-ANCHOR ([Chapitre 3](#)), a été effectuée par microscopie à fluorescence, Leica DMLB à l'IMT Mines Alès (objectif x10 et x40).

Un deuxième microscope à fluorescence a été utilisé à Toulouse pour l'acquisition d'images : à plus haute résolution ou pour réaliser une vidéo comme décrit précédemment [\[279\]](#) à l'aide d'un Zeiss Axiovert Observer Z1. L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji.

- Les cellules Sf9 infectées par AcMNPV1-ANCHOR3 ont été observées à l'aide d'un objectif x63.
- La visualisation des larves de *Spodoptera exigua* ou *Cydia pomonella* a été réalisée à l'aide d'un objectif x10.

VI.6.2. Microscopie électronique (ME)

VI.6.2.1. Microscopie électronique à transmission (MET)

Le MET permet d'obtenir une image agrandie d'objets grâce à un faisceau d'électrons focalisé par des lentilles magnétiques [\[280\]](#). Les électrons traversent l'échantillon (résolution 0,1 nm ou 1 Å (angström)) et permettent ainsi l'observation de l'organisation et de la structure interne. Cette méthode a été utilisée pour obtenir les images des ODV ([Chapitre 3](#), [Figure 23](#)). Ces ODV ont été obtenus par ultracentrifugation (Beckman Coulter optima le -80k centrifuge) à 25000 rpm pendant 1 heure à 4°C.

VI.6.2.2. Microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE)

Le MEBE permet d'obtenir une représentation de la topographie d'un échantillon (1 nm) en balayant à la surface des échantillons avec le faisceau d'électrons ce qui permet une reconstitution des

images en 3 dimensions. Dans ce projet de recherche nous avons utilisé un MEB environnemental (vide faible de 0,68 et 0,98 Torr). L'avantage de celui-ci est qu'il ne nécessite pas de coloration et le vide faible évite l'ébullition et l'extraction de l'eau des échantillons. Plusieurs images ont été obtenues par cette technique : les morsures des larves à la surface des feuilles (ne dessèche pas les feuilles au cours de l'observation) ainsi que la comparaison des deux systèmes de pulvérisation utilisés en verger ([Chapitre 5](#)).

CHAPITRE 3¹ : TRAÇAGE D'INFECTIONS PAR BACULOVIRUS À L'AIDE DE LA TECHNOLOGIE ANCHORTM

I. INTRODUCTION

La compréhension des mécanismes d'infections multiples des baculovirus exige de suivre chaque étape du processus d'infection, tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'insecte tout entier.

Les avancées techniques ont permis de progresser dans la compréhension du processus infectieux. Les premières observations abordaient ces processus au niveau des modifications majeures du comportement de l'insecte ou de la structure des organes larvaires. Il s'agissait des premières observations de pathologie [30]. Le développement de l'histologie a permis de descendre au niveau des organes, des tissus et des cellules [281]. La microscopie électronique a permis d'obtenir des images d'étapes spécifiques de l'infection virale. La suite temporelle a pu être reconstruite dans certains cas par assemblage d'images, mais le suivi en temps réel reste toujours un enjeu.

Au début des années 1980, le niveau élevé d'expression du gène de la polyédrine a attiré l'attention pour ses applications biotechnologiques [55,282,283], principalement pour la production de protéines en culture cellulaire ou *in vivo* chez l'insecte [96,284]. Avec ce système il est possible de modifier la régulation des gènes, et donc de moduler la quantité des protéines exprimées, et leurs modifications post-traductionnelles [89]. Deux baculovirus se sont généralisés comme systèmes d'expression, AcMNPV et BmNPV, pour lesquels des cultures de cellules performantes existent. Cette généralisation de l'utilisation de baculovirus en biotechnologie permet de tirer profit des outils ainsi développés pour l'étude des relations virus-hôte, et pour la validation de techniques à utiliser avec d'autres baculovirus en lutte biologique.

¹ Des parties de ce chapitre ont été publiées dans l'article : Hinsberger, A., Graillot, B., Lopez-Blachere, C., Juliant, S., Cerutti, M., King, L. A., Possee, R. D., Gallardo, F., Lopez-Ferber, M. (2020). Tracing baculovirus AcMNPV infection using a real-time method based on ANCHORTM DNA labeling technology. *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/v12010050>

Dans ce chapitre, la technologie ANCHORTM a été intégrée à notre modèle d'étude, en partenariat avec l'entreprise NeoVirTech (Toulouse, France) qui l'a développée. Le marquage par fluorescence a déjà contribué à la compréhension actuelle du cycle d'infection des baculovirus, grâce à l'intégration d'un marqueur facile à reconnaître dans le génome du baculovirus, par exemple les marqueurs fluorescents comme la GFP (*Green Fluorescence Protein*). L'expression de ces marqueurs permet l'identification des cellules infectées. Le marquage des particules virales (chimiquement ou par l'utilisation de protéines de fusion) permet de suivre l'entrée ou la sortie du virus de la cellule. Cependant, ces approches ont des limites. L'expression dans la cellule infectée nécessite l'activation du cycle viral, ce qui empêche de suivre les premières étapes de l'infection. Le marquage des protéines de structure du virus donne généralement un signal de faible niveau, et ne permet pas de suivre le cycle du virus entre le désassemblage de la capside et la sortie du virus. C'est pour palier à l'ensemble de ces problèmes, et suivre les infections multiples, que nous avons adapté la technologie ANCHORTM à deux baculovirus, AcMNPV-ANCHOR comme preuve de concept, puis au modèle d'étude CpGV-ANCHOR.

II. TECHNOLOGIE ANCHORTM

La technologie ANCHORTM est dérivée d'un élément génétique bactérien : le système parABS, qui permet la ségrégation et la partition des plasmides lors de la division cellulaire bactérienne [285,286]. Le système parABS est composé de : *parA* (ATPase), *parB* (protéine de liaison à l'ADN) et *parS* (séquence d'ADN agissant en *cis*). La technologie ANCHORTM contient un site d'ancrage cible ANCH (provient de *parS*) et un gène codant la protéine OR (codée par *parB*), fusionnée à une protéine fluorescente (comme la GFP ou mRFP) ; OR-FP se lie à l'ADN au niveau du site ANCH. Une fois qu'une liaison ANCH/OR-FP stable est établie, un processus de multimérisation se produit, et jusqu'à 500 molécules de OR-GFP peuvent se lier à une même molécule d'ADN. Une telle accumulation entraîne une amplification du signal et permet ainsi de détecter la cible ADN (Figure 20) [287].

Les systèmes d'ancrage ont été utilisés avec succès pour analyser : le mouvement des *loci* génomiques et le traitement des cassures de double brin d'ADN chez la levure [288], l'évaluation de l'effet du Ganciclovir sur le cytomégalovirus humain HCMV [279], l'infection par l'adénovirus et la réplication biphasique du génome [289], ou encore la dynamique de la chromatine pendant la transcription dans les cellules humaines [287].

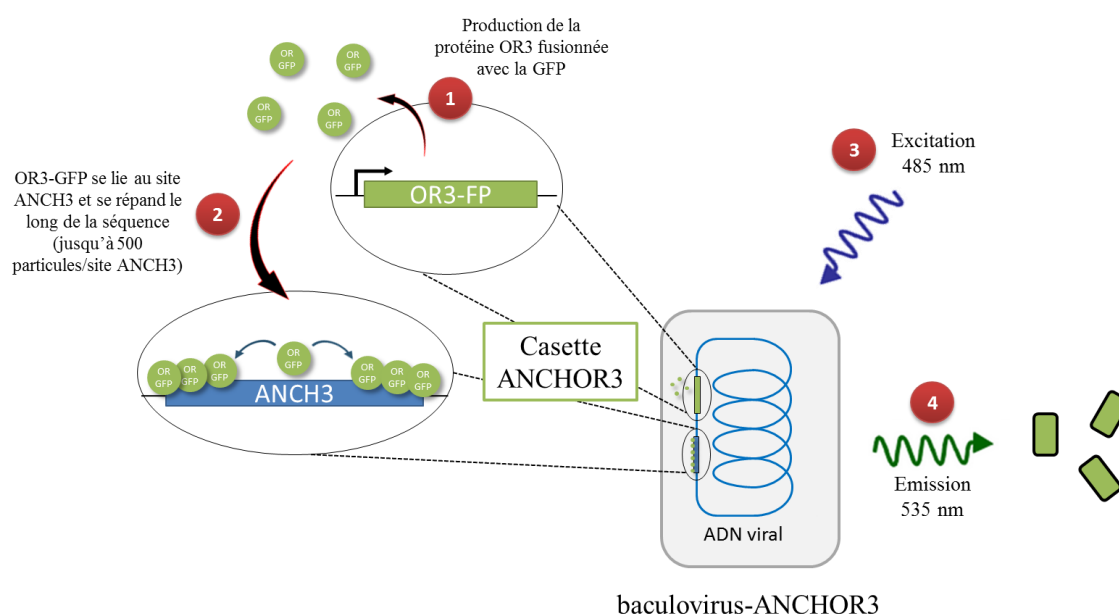


Figure 20 : Fonctionnement d'un baculovirus modifié ANCHOR3™.

III. APPLICATION DE LA TECHNOLOGIE AUX

BACULOVIRUS : PREUVE DE CONCEPT AcMNPV-ANCHOR

Dans ce chapitre, à titre de preuve de concept, la technologie de marquage de l'ADN ANCHOR a été adaptée pour le suivi d'*Autographa calinornica multiple nucléopolyédrovirus* (AcMNPV) dans les cellules vivantes. Tout d'abord, nous avons créé un génome viral AcMNPV contenant à la fois la séquence cible ANCH et le gène codant pour la protéine OR-FP (AcMNPV-ANCHOR).

III.1. Synthèse de AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1

III.1.1. Construction des plasmides

Deux virus ont été construits : le virus AcMNPV-ANCHOR3 et le virus AcMNPV-ANCHOR1. La construction des deux vecteurs de transfert a été réalisée par Benoit Graillot au cours d'un contrat post doctoral. Toutes les constructions plasmidiques ont été réalisées et amplifiées dans la bactérie *E. coli* XL1.

Les deux composants ANCH3 et OR3 ont été obtenus par amplification PCR (Vent® DNA Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) à partir des plasmides pANCH3 et OR3GFP (fournis par NeoVirTech). Des sites d'enzymes de restriction appropriés au clonage ont été rajoutés aux extrémités des deux séquences. Le fragment OR3 (1786 bp) codant le gène *or3-gfp* (codant la protéine correspondante qui se lie spécifiquement à la séquence ANCH3 fusionnée à la GFP), a été inséré au

niveau des sites *Bam*HI et *Eco*RI. Pour permettre l'expression continue du gène *or3-gfp* lors de l'infection du baculovirus, le promoteur A3 (685 bp) de *Bombyx mori* (prA3) est inséré en amont (numéro d'accès GenBank HQ918291.1) et encadré par les sites *Not*I et *Nco*I. Le fragment contenant ANCH3 (982 bp) a été inséré entre *Sbf*I et *Not*I. Pour permettre la recombinaison du virus, des séquences d'origine virale ont été insérées aux extrémités de la cassette ANCHORTM, annotées p1 (2000 bp à partir du nucléotide 2428 du génome de AcMNPV) et p2 (2430 bp à partir du nucléotide 4428 du génome de AcMNPV). Le fragment p1 est encadré par les enzymes *Sbf*I et *Sma*I, le fragment p2 est encadré par les enzymes *Xma*I et *Afl*III (Figure 21).

Pour obtenir le virus AcMNPV-ANCHOR1, les fragments ANCH3 et OR3 ont été excisés du plasmide pUC19-ANCHOR3 et remplacés (aux mêmes sites de restriction) par les fragments contenant ANCH1 (1346 bp) et OR1 (1818 bp) (Figure 21). Le fragment OR1 contient le gène *or1-mRFP*. Ce gène code pour la protéine OR1 qui est fusionnée à mcherryRFP et se lie spécifiquement à la séquence ANCH1.

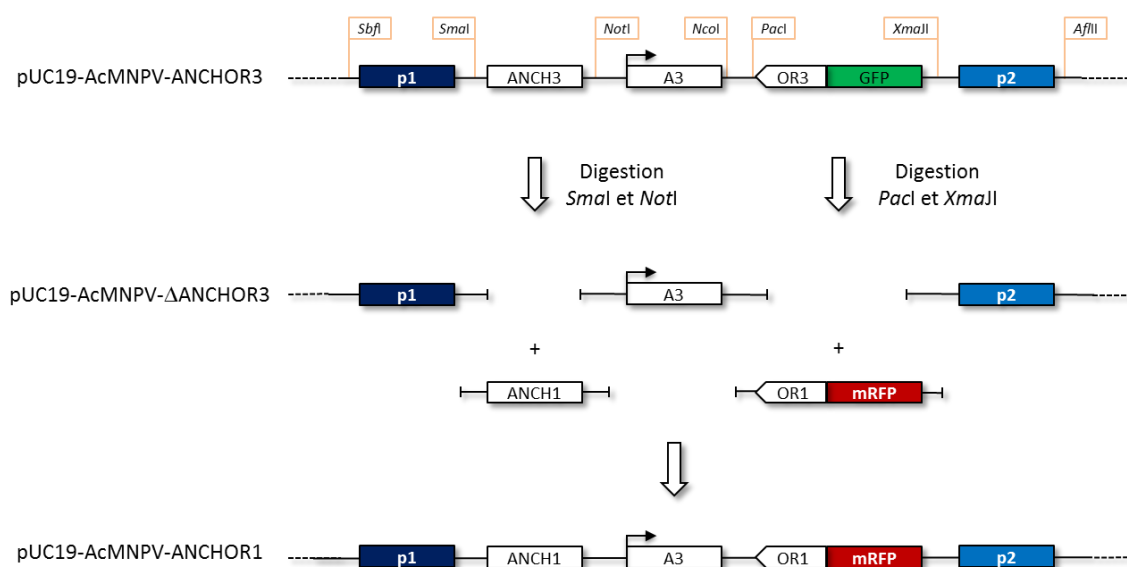


Figure 21 : Construction des plasmides pUC19-AcMNPV-ANCHOR3 et pUC19-AcMNPV-ANCHOR1.

Toutes les constructions ont été vérifiées par leur profil de restriction. Les deux ADN des vecteurs de transfert ont été purifiés à l'aide de NucleoBond[®] Xtra Midi (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

III.1.2. Co-Transfection

Les co-transfections ont été réalisées lors d'un déplacement à Oxford Expression Technologie (OET), en collaboration avec les Pr. Linda King et Robert Possee. Elles ont été effectuées sur des cellules

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) en utilisant la Bacfectine comme agent de transfection (Figure 22). Les virus recombinants ont ensuite été isolés par la technique des plages pour obtenir des stocks de virus purs. Pour ce faire, 2 mL de cellules *Sf9* à 10^6 cellules.mL⁻¹ ont été placés dans des plaques Falcon® à 6 puits, dans un milieu sans sérum supplémenté avec 0,5% de pénicilline-streptomycine et 1% d'acide pluronique pendant 1 heure. Le milieu a ensuite été éliminé. Les cellules ont été infectées avec 500 µL de chaque virus à différentes concentrations, et incubées pendant 1 heure à température ambiante ; puis l'inoculum a été retiré. 2 mL de milieu avec 1% (p/v) d'agarose ont été ajoutés dans chaque puit, les plaques ont ensuite été incubées pendant 5 jours à 28°C [290].

Les virus recombinants (prélevés précisément dans l'agarose là où une zone de lyse cellulaire apparaît) ont ensuite été amplifiés à des titres élevés (2×10^7 PFU.mL⁻¹) et conservés à 4°C. Le titre du virus a été déterminé par la technique des plages de lyse [290].

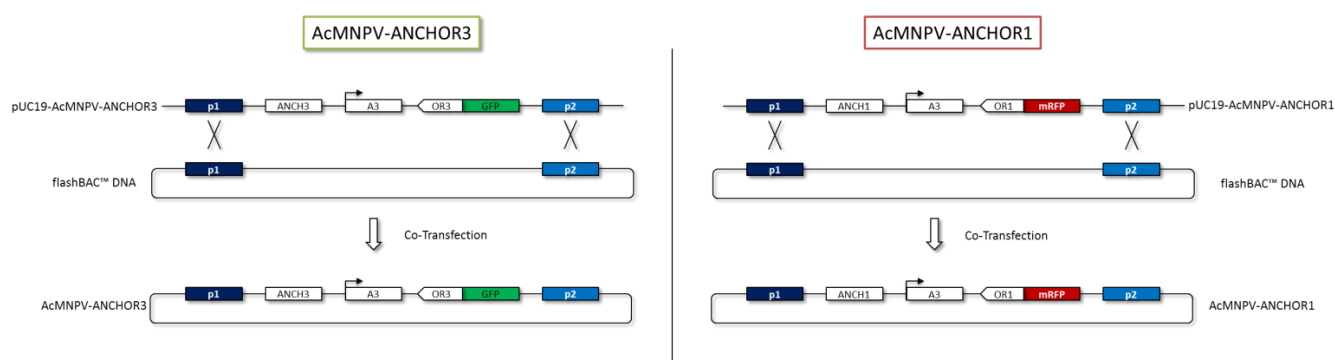


Figure 22 : Construction des virus AcMNPV-ANCHOR obtenus par recombinaison entre le plasmide pUC19-ANCHOR et l'ADN viral (flashBAC™ DNA).

III.2. Caractéristiques biologiques et structurales du virus recombinant AcMNPV-ANCHOR3

AcMNPV ANCHOR3 et AcMNPV ANCHOR1 présentent le même type de modification génétique. Par conséquent, seules les caractéristiques biologiques de AcMNPV-ANCHOR3 ont été analysées.

L'association d'un nombre élevé (jusqu'à 500 copies) de la protéine de fusion OR3-GFP au génome viral pourrait interférer avec la structure de la nucléocapside du virus. Par conséquent, la structure des virions a été analysée au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) ou à transmission (MET) (Figure 23). Aucune différence de structure des virions n'a été observée.

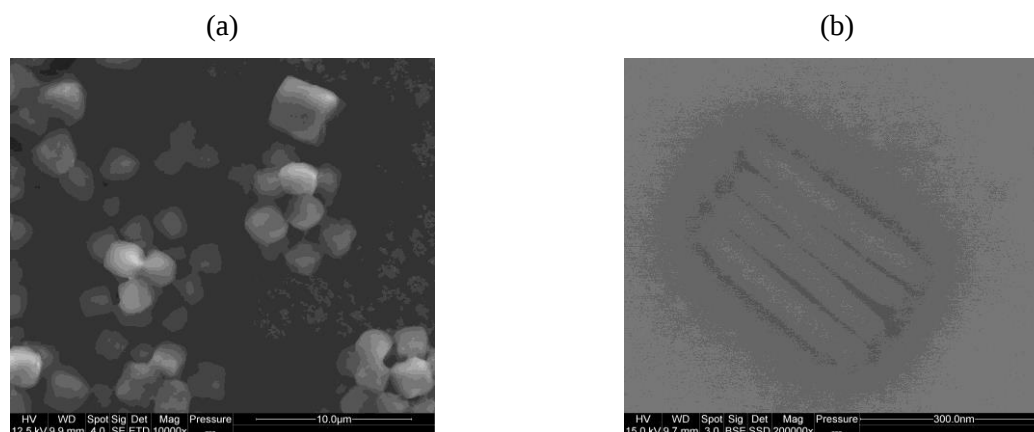


Figure 23 : Morphotypes de AcMNPV-ANCHOR3 visualisés par (a) MEB pour les OB et par (b) MET pour l'ODV.

La réplication du virus AcMNPV-ANCHOR3 a été observée *in vitro* et *in vivo*. Des cellules *Sf9* et des larves de *Spodoptera exigua* ont été infectées par le virus recombinant. Aucun retard n'a été observé dans la formation des OB.

L'observation des cellules infectées, au microscope à fluorescence, a confirmé que des OB ont été produits. La fluorescence était concentrée dans ces OB donnant un aspect de « spots » aux particules virales (Figure 24a). La fluorescence présente sous forme diffuse dans le cytoplasme est due à l'expression de la protéine OR3-GFP avant la migration vers le noyau, qui se condense avec l'ADN viral contenant ANCH3. Aux premiers stades de l'infection, il est possible de voir des spots fluorescents dans le cytoplasme ou dans la membrane cytoplasmique. Ces spots correspondent à la migration de la nucléocapside et à la sortie du virus bourgeonné. L'infection des cellules a pu être suivie en microscopie à fluorescence, bien que l'amplitude de la variation de fluorescence n'ait pas permis de régler un seul focus pour toute la durée de l'infection.

Les OB ont été utilisés pour infecter oralement des larves de *Spodoptera exigua* de troisième stade (âgées de 7 jours). 48 heures post-infection (hp.i.), les larves vivantes ont été observées sous un microscope confocal à fluorescence. L'infection des tissus a été observée, en particulier au niveau de l'épithélium trachéal (Figure 24b,c). Même si la cuticule de la larve présente une autofluorescence avec les filtres d'excitation/émission utilisés, la présence de particules fluorescentes dans l'intestin moyen et les tissus trachéaux peut être observée.

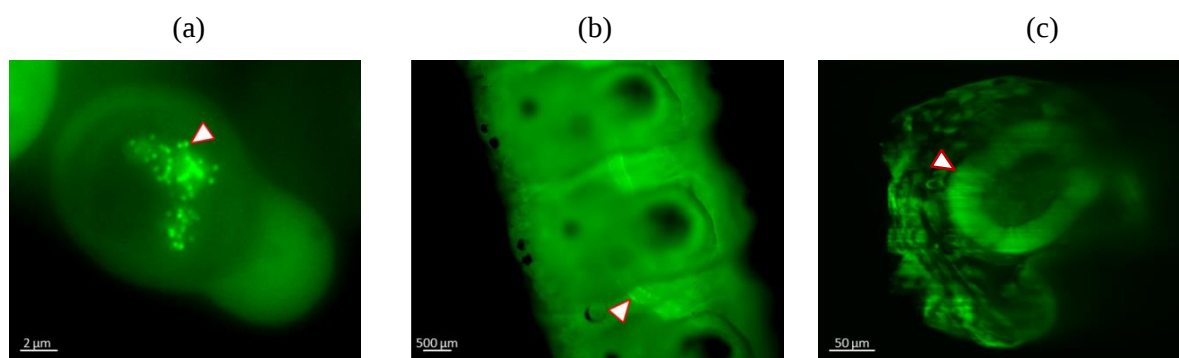


Figure 24 : Visualisation par microscopie à fluorescence à l'aide d'un observateur Zeiss Axiovert Z1 d'une infection par AcMNPV-ANCHOR3 dans (a) des cellules de *Sf9*, (b) une larve de *Spodoptera exigua* et (c) une reconstruction en coupe transversale de la larve montrant une infection de l'intestin moyen.

Une comparaison entre les dynamiques de production virale des virus de type sauvage et des virus recombinants a été réalisée (Figure 25). Un taux de réplication légèrement inférieur et un titre final de BV plus faible ont été obtenus pour les virus recombinants. Le titre final d'AcMNPV-ANCHOR3 était de $1,24 \times 10^7$ OB.mL⁻¹ contre $2,07 \times 10^7$ OB.mL⁻¹ pour les AcMNPV-Wt.

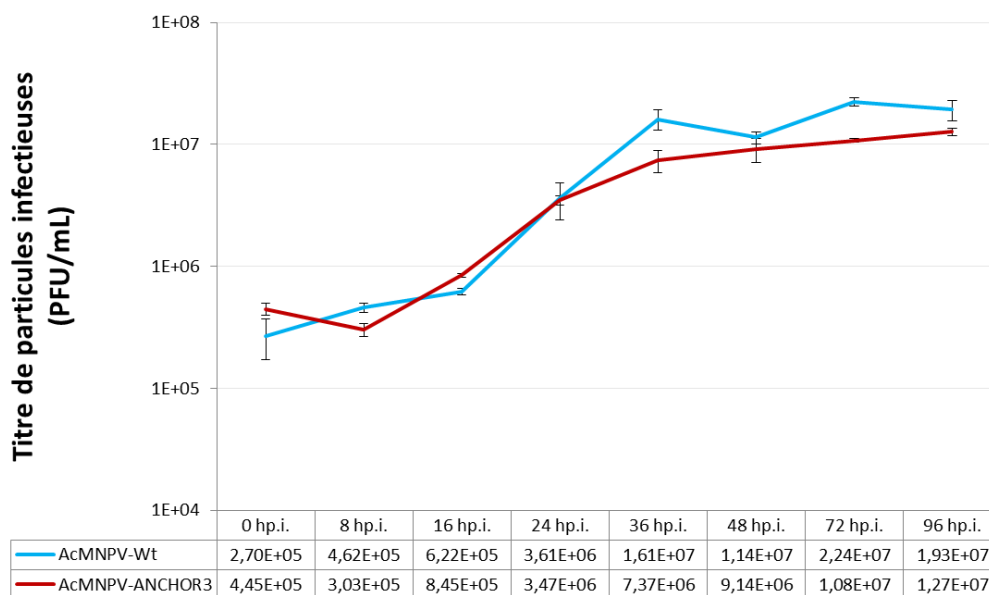


Figure 25 : Titres viraux des baculovirus AcMNPV-Wt (phénotype sauvage) et du baculovirus recombinant AcMNPV-ANCHOR3 au cours d'une cinétique d'infection. Les titres correspondent à la moyenne de trois titrages indépendants.

Des passages successifs des virus AcMNPV-Wt et AcMNPV1-ANCHOR3 ont été effectués sur cultures cellulaires (A_i , i correspondant au numéro de passage) pour analyser la stabilité des virus.

Les titres viraux des passages A3, A4 et A5 ont été mesurés pour les deux virus par dosage en plaque (Tableau 7) ; la moyenne et l'écart-type (ET) sont également indiqués. Le titre d'AcMNPV-Wt était toujours légèrement supérieur à celui de AcMNPV-ANCHOR3, conformément aux résultats obtenus dans l'expérience de croissance.

Tableau 7 : Titres viraux obtenus par titration en plaques entre les différents passages (A_i) de AcMNPV-Wt et AcMNPV-ANCHOR

	A3	A4	A5	Moyenne	Écart type
AcMNPV-Wt	$5,80 \times 10^7$	$9,10 \times 10^6$	$1,93 \times 10^7$	$2,88 \times 10^7$	$2,58 \times 10^7$
AcMNPV-ANCHOR3	$2,42 \times 10^7$	$3,12 \times 10^6$	$1,27 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$

III.3. Suivi de l'infection en temps réel

L'infection des cellules *Sf9* par AcMNPV-ANCHOR3 a été suivie par microscopie à fluorescence avec un intervalle de temps de 30 min pendant 17 hp.i. pour le premier essai et de 10 min de 21 hp.i. à 42 hp.i. pour le deuxième. La taille d'une particule BV est à la limite de la résolution du microscope optique et apparaît donc comme un seul pixel. Des événements d'infection spécifiques ont été saisis : des BV bourgeonnants hors de la cellule, des virus ANCHOR3 nouvellement produits marqués dans le milieu de culture et la production et la libération d'OB (Figure 26).

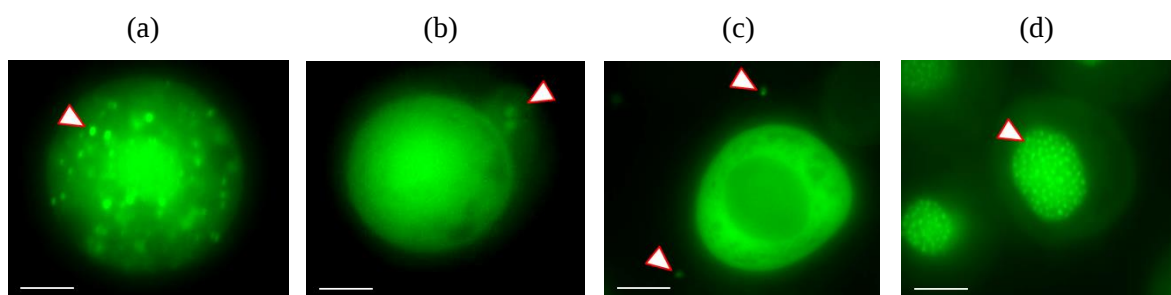


Figure 26 : Événements d'infection des cellules *Sf9* par AcMNPV-ANCHOR3 visualisés avec un microscope Zeiss Axiovert Z1 (objectif $\times 63$) (a) Nucléocapsides qui migrent du noyau vers la membrane cytoplasmique pour libérer des BV ; (b) BV libérés par la cellule infectée ; (c) Néo-virus dans le milieu de culture ; (d) OB accumulés dans le noyau de la cellule infectée.

Échelle = 10 μ m.

Des images représentatives du cycle d'infection sont présentées dans la [Figure 27](#). En raison de la forte variation du niveau de fluorescence, il n'a pas été possible d'obtenir l'ensemble du cycle viral avec un seul temps d'exposition. Celui-ci a dû être réduit en fin d'expérience. Les premières étapes de l'infection (6 hp.i. à 8 hp.i.) sont présentées dans la [Figure 27a](#). Les virus marqués avec ANCHOR3 apparaissent sous forme de « spots » fluorescents à 6,5 hp.i. dans le noyau. Ce nombre de spots dans le noyau augmente avec le temps.

Les étapes finales de l'infection sont illustrées dans la [Figure 27b](#). À 28 hp.i., de multiples OB sont visibles, mais des quantités considérables de fluorescence non condensée sont également présentes dans le noyau. Elles correspondent à des génomes viraux qui n'ont pas été encapsidés. À 29 hp.i., les cellules commencent à se détacher de la surface du flacon de culture ; de plus, la fluorescence semble plus diffuse. Après 32 hp.i., les cellules sont mortes et les OB libres ou agrégés sont dispersés dans le milieu de culture.

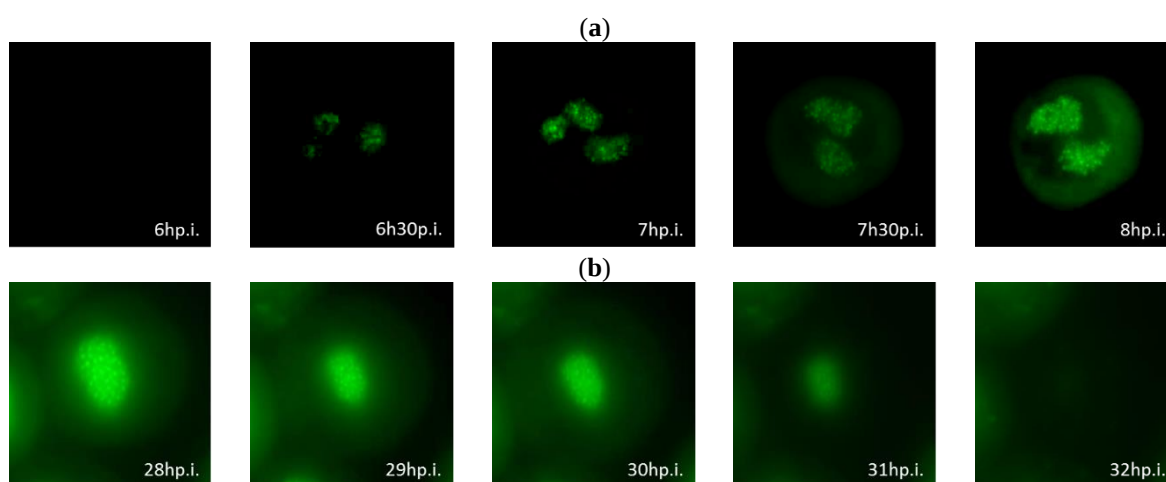


Figure 27 : Infection des cellules Sf9 par AcMNPV-ANCHOR3 visualisée avec le microscope Zeiss Axiovert Z1 (objectif x63) (a) au début de l'infection : 6 hp.i. à 8 hp.i. (b) à la fin de l'infection : 28 hp.i. à 32 hp.i.

III.4. Quantification des BV par fluorimètre

La relation entre le nombre de BV libérés dans le milieu de culture et le niveau de fluorescence, a été analysée à 0, 8, 16, 24, 36, 48, 72 et 96 hp.i. Le niveau de fluorescence, exprimé en unité de fluorescence relative (RFU) a été tracé en fonction du temps d'infection ([Figure 28a](#)). La fluorescence de AcMNPV-Wt a été utilisée comme témoin négatif et soustraite de celle des virus recombinants. Dans la [Figure 28a](#), l'intensité de la fluorescence de 0 hp.i. à 16 hp.i. suit une phase de latence, puis entre dans une phase exponentielle jusqu'à 48 hp.i., qui marque la phase stationnaire.

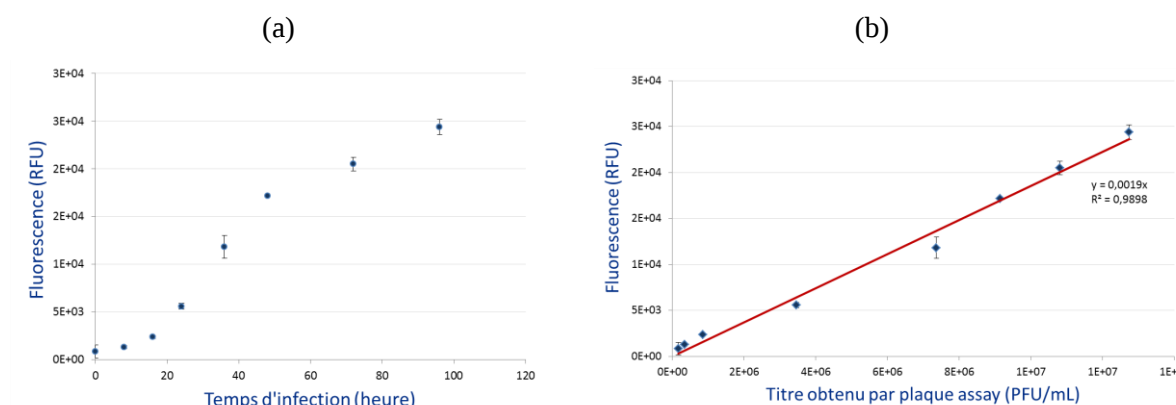


Figure 28 : Fluorimétrie des infections cellulaires par AcMNPV-ANCHOR3. (a) Quantification fluorimétrique de la production de BV recombinants. (b) Corrélation entre le comptage fluorimétrique et l'estimation du nombre de BV en plaques.

Afin de déterminer le lien entre l'intensité de la fluorescence de AcMNPV-ANCHOR3 et la concentration virale, les droites RFU ont été tracées, en fonction des titres de virus obtenus par titration en plaques (Figure 28b). Une corrélation de $R^2 = 0,98$ a été obtenue. Cette linéarité indique que la lecture fluorimétrique peut être utilisée comme une méthode quantitative. La limite de détection (LoD) de la méthode de lecture fluorimétrique est d'environ 50 BV, tandis qu'un BV peut être identifié par microscopie.

III.5. Infection avec un mélange AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1

Les cellules Sf9 ont été infectées avec un mélange de deux virus AcMNPV recombinants : AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1 (50-50), aux MOI (*Multiplicity of infection*) de 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 virus par cellule. Ces différentes infections ont été suivies en temps réel par microscopie à fluorescence. Certaines cellules sont infectées par AcMNPV-ANCHOR3 (signal excité à 395 nm et émis à 509 nm, représenté dans le canal vert) et d'autres par AcMNPV-ANCHOR1 (signal excité à 587 nm et émis à 610 nm, représenté dans le canal rouge) (Figure 29).

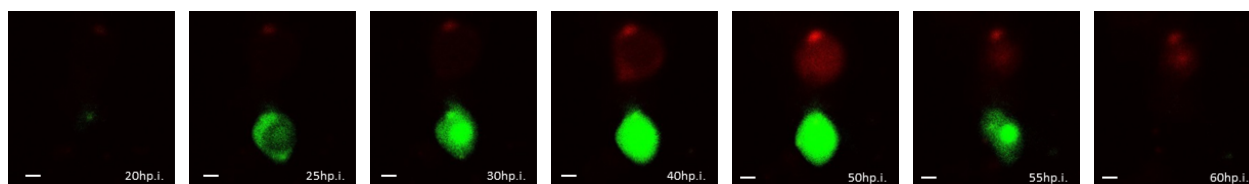


Figure 29 : Cellules Sf9 infectées par un mélange AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1. Ces images résultent de la superposition des canaux GFP et mRFP. Échelle 10 μ m.

Si la MOI est suffisamment importante, on observe des coinfections d'une même cellule avec AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1. Lorsque les virus sont colocalisés, les signaux de fluorescence se superposent, on obtient un signal « jaune » (Figure 30). Aucune coinfection n'a été observée avec une MOI de 0,25. Ceci semble cohérent, si la concentration virale est faible, alors la probabilité pour que deux virus infectent une même cellule, est quasi nulle. En revanche à une MOI de 2, le taux de coinfection a été estimé à environ 3%.

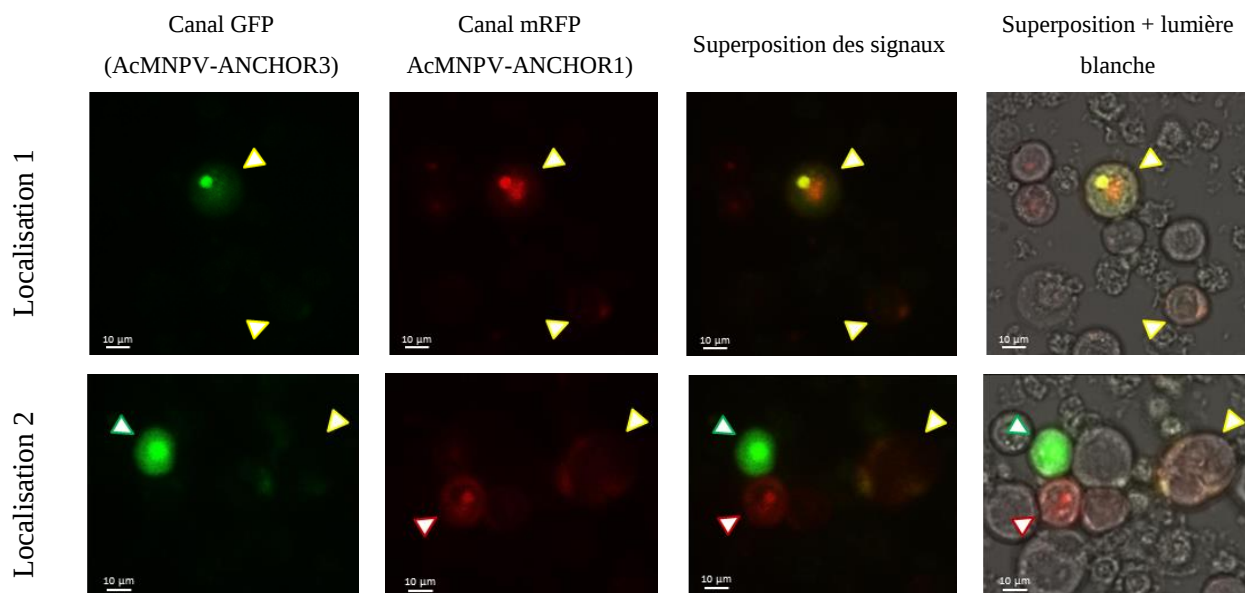


Figure 30 : Cellules Sf9 coinfectedées par AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1. Deux localisations sont représentées montrant des cellules infectées soit par AcMNPV-ANCHOR3 (flèche verte), soit par AcMNPV-ANCHOR1 (flèche rouge), soit par les deux (flèche jaune).

D'après Beperet *et al.* les cellules Sf9 sont permissives au virus AcMNPV jusqu'à 16 heures après l'entrée du premier virus [130]. Suivant le modèle, des infections différées entre les deux virus ont été réalisées jusqu'à 4 heures d'intervalle ; où des cellules co-infectées ont aussi été obtenues.

IV. APPLICATION DE LA TECHNOLOGIE : CpGV-M-ANCHOR3 ET CpGV-R5-ANCHOR1

IV.1. Absence de modèle cellulaire

L'étude des interactions entre les différents génotypes du CpGV est l'objet principal de la thèse, mais l'absence de cultures cellulaires rend plus difficile leur obtention. Pour les aborder, il a été

nécessaire d'adapter la technologie ANCHOR™ aux différents géotypes de CpGV. Pour ce faire, les différents plasmides contenant des séquences homologues spécifiques ont été construits, puis un clonage *in vivo* a été réalisé pour obtenir les virus recombinants.

IV.2. Synthèse des virus recombinants CpGV-M-ANCHOR3 et CpGV-R5-ANCHOR1

IV.2.1. Construction des plasmides

Dans cette partie du projet, deux virus recombinants ont été construits, chacun avec l'un des deux systèmes de marquage spécifique (ANCHOR3 et ANCHOR1) : le virus CpGV-M-ANCHOR3 et le virus CpGV-R5-ANCHOR1, donc couplés chacun à un fluorochrome distinct.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le plasmide modifié pUC19-ANCHOR3 (obtenu précédemment pour le virus AcMNPV-ANCHOR, III.1.1). Sur ce plasmide les fragments permettant la recombinaison entre le plasmide et les virus CpGV p1 et p2 ont été insérés aux extrémités. La région de recombinaison (région entre ORF112 et ORF113) contient un site unique (*Sfi*I). Ainsi en digérant l'ADN viral du CpGV, le ratio de virus recombinants par rapport au virus sauvage est augmenté au cours de la transfection [291]. De plus, les deux parties p1 et p2 ont été choisies de sorte à éviter les régions palindromiques [292].

Les deux fragments (p1 et p2) sont équivalents entre CpGV-M et CpGV-R5 ; p1 (1841 bp en position 94171 sur CpGV-M) et p2 (784 bp en position 95998 sur CpGV-M). Ainsi, les mêmes plasmides pUC19-ANCHOR3 et pUC19-ANCHOR1 peuvent être utilisés pour la recombinaison des deux virus CpGV-M et CpGV-R5.

Une fois le plasmide pUC19-CpGV-ANCHOR3 obtenu, les fragments contenant ANCH3 et OR3-GFP sont excisés et remplacés par les fragments contenant : ANCH1 et OR1-mRFP (respectivement) (Figure 31).

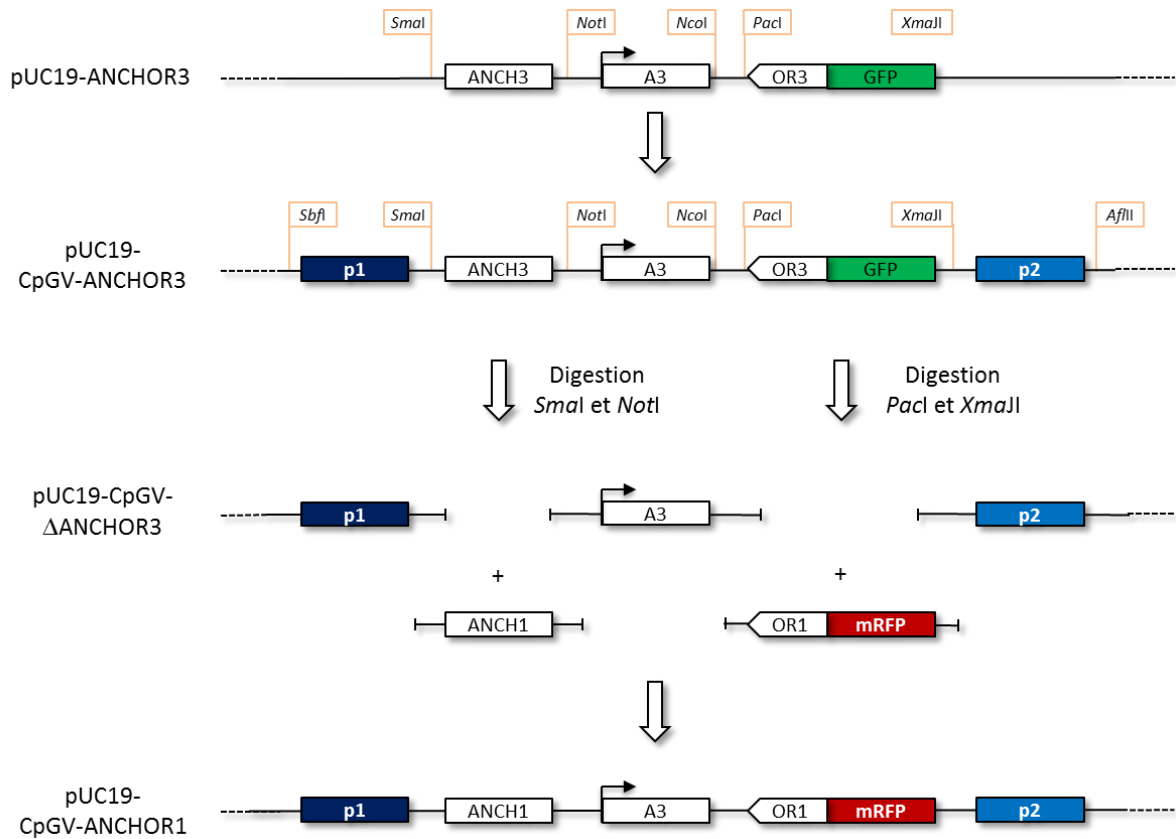


Figure 31 : Construction des plasmides CpGV-ANCHOR.

IV.2.2. Co-Transfection, purification et amplification

Nous ne disposons pas de lignée cellulaire suffisamment stable permettant la multiplication *in vitro* du virus CpGV. Les co-transfections des virus CpGV ont donc été réalisées *in vivo*.

Les ADN viraux (CpGV-M ou CpGV-R5) ont été extraits et purifiés par des protocoles phénol-chloroforme. Ces ADN ont ensuite été digérés par l'enzyme *SfiI* (site unique dans le génome du virus sauvage). En linéarisant l'ADN, on le rend incapable d'infecter les larves.

Ensuite, on injecte aux larves (CpNPP ou R_{GV}) à l'aide d'une seringue (Becton Dickinson®, BD324826) environ 1 µL d'un mélange (volume final 300 µL) contenant 0,5 µg d'ADN viral digéré par *SfiI* (CpGV-M ou CpGV-R5), 2,5 µg de plasmide (pUC19-ANCHOR3 ou pUC19-ANCHOR1), 40 µL de DOTAP (agent transfectant), et du bleu colorant alimentaire (E132) qui permet de visualiser l'injection dans la larve (Figure 32).

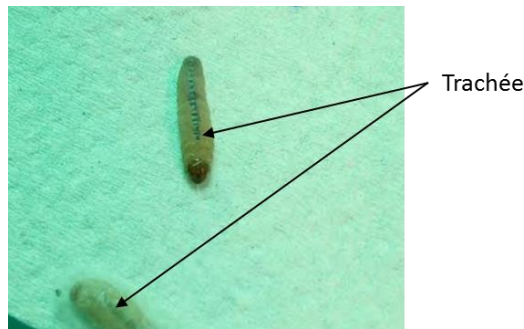


Figure 32 : Larves dans lesquelles le mélange de transfection a été injecté.

Les larves transfectées sont déposées en surface de plaques à 24 puits remplis d'environ 1g de milieu (Stonefly Heliiothis Diet, Ward's Science, Rochester, NY, États-Unis), pour 5 à 6 jours d'incubation avant de récupérer les virus recombinants. Il est impossible de garantir une digestion complète des génomes viraux par *Sfi*I. Comme conséquence, le mélange contient des génomes circulaires, hautement infectieux, et d'autres linéarisés, qui ne sont pas infectieux, sauf s'ils ont bien recombinaison avec le plasmide. D'après Hajós, le taux de recombinaison *in vivo* se situe entre 2 et 20% [291]. C'est pourquoi une succession de purifications *in vivo* a été réalisée, suivie d'une amplification afin de créer le stock viral qui a servi aux essais.

IV.3. Méthodes de sélection des CpGV-ANCHOR recombinants

IV.3.1. Sélection par microscopie à fluorescence

Les larves infectées par du virus recombinant ont été sélectionnées par observation en microscopie à fluorescence (Leica DMLB à l'IMT Mines Alès). Pour cela, elles ont été broyées dans de l'eau ; leurs tissus ont été observés entre lame et lamelle (Figure 33). Les particules virales sont représentées par des flèches.

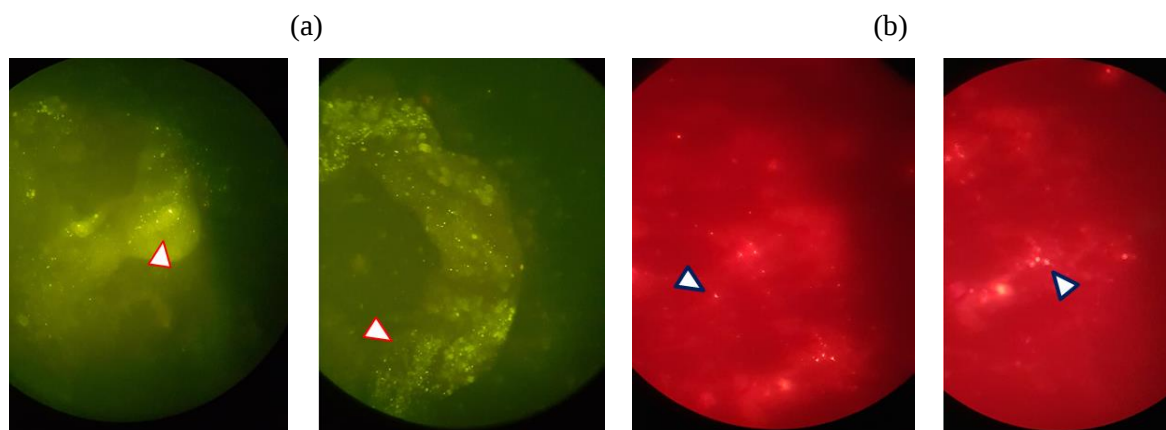


Figure 33 : Tissus de larves infectées par (a) CpGV-ANCHOR3, visualisation canal GFP (b) CpGV-ANCHOR1, visualisation canal mRFP. Objectif x10.

IV.3.2. Sélection par qPCR

La présence du virus recombinant a été confirmée par qPCR, en amplifiant un fragment de 173 bp au niveau du promoteur A3. Les détails de la qPCR sont référencés dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Mélanges réactionnels et cycles de qPCR

Mix PCR	Programme du thermocycleur	
500 nM de chaque amorce (Chapitre 2)	Activation Taq polymérase	90°C 15 min
4 µL de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne)	Dénaturation	95°C 15 s
5 µL d'ADN viral	Appariement	60°C 40 s
Eau QSP 20 µL	Extension	72°C 30 s
	40 cycles	

Plusieurs contrôles positifs ont été utilisés, le plasmide de construction ayant servi aux co-transfections (contient la cassette ANCHOR™), ainsi que l'amplification d'un fragment du gène *pe38* (gène décrit dans le [Chapitre 4](#)) de 121 pb pour CpGV-M.

La taille des amplicons obtenus a d'abord été vérifiée en gel d'agarose *low melting high resolution* à 2% ([Figure 34](#)). Tous les échantillons présentent une amplification du gène *pe38* mais seuls les trois premiers échantillons présentent une amplification au niveau du promoteur A3 (cassette ANCHOR), qui indique la présence de virus CpGV-ANCHOR recombinant. Les amplicons ont été séquencés par

EurofinsMWG (Ebersberg, Allemagne). Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide de Clone manager V9 (logiciel SCI-ED).

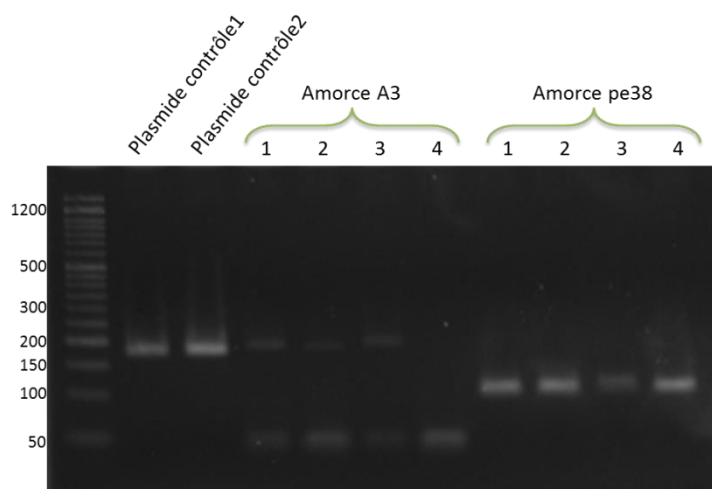


Figure 34 : Électrophorèse des produits PCR des amplifications individuelles CpGV-ANCHOR.
Marqueur de poids moléculaire utilisé 50 bp DNA ladder Nippon Genetics.

IV.3.3. Sélection par quantification de la fluorescence

Pour estimer la quantité de virus recombinants, l'intensité de la fluorescence a été mesurée sur un lecteur de fluorescence Tecan Spark™ ; lecteur de microplaques 10M utilisant le logiciel SparkControl V1.2.20, à l'aide de plaques noires à fond plat de 96 puits, remplies de 100 µL de milieu surnageant de broyat de larves infectées. Les longueurs d'ondes d'excitation utilisées étaient de 395 nm pour ANCHOR3 et 508 nm pour ANCHOR1, la longueur d'ondes d'émission de 587 nm pour ANCHOR3 et 610 nm pour ANCHOR1 (largeur de bande de 20 nm pour tous). La cuticule possède une auto-fluorescence importante ; c'est pourquoi il est crucial d'utiliser comme référence des larves infectées avec du virus natif.

V.DISCUSSION ET CONCLUSION

La possibilité de suivre le processus d'infection au niveau cellulaire chez les insectes est l'un des verrous technologiques qu'il fallait lever pour comprendre les défenses érigées par l'insecte ; plus particulièrement dans notre cas les défenses de *Cydia pomonella* qui s'adapte aux différents génotypes de CpGV.

Le marquage chimique des particules virales, ou la détection de ces particules par immunomarquage, ont permis de capturer des vues spécifiques du processus d'infection ; tandis que l'utilisation de virus modifiés exprimant des gènes marqueurs a permis d'identifier la propagation de l'infection d'une cellule à une autre. L'une des limites de toutes ces techniques est l'impossibilité de suivre

ce processus d'infection d'un seul génome dans les cellules vivantes : de l'entrée du virus dans le noyau, jusqu'aux génomes viraux de la descendance. Il est donc devenu nécessaire de marquer l'ADN d'une manière spécifique. Le développement de la technologie ANCHORTM, basée sur le système de partition bactérien parABS, est apparu comme un moyen intéressant d'atteindre cet objectif. Le marquage selon cette approche, permet de recouvrir l'ADN viral avec un nombre relativement élevé de protéines OR-FP. Dans des travaux antérieurs [293], il a été estimé que la cassette ANCH3 induit la polymérisation jusqu'à 500 copies de la protéine OR-FP (Figure 20).

La faisabilité de cette approche sur les baculovirus a été expérimentée en premier lieu sur AcMNPV, un baculovirus modèle, pour lequel des cultures cellulaires et des outils biotechnologiques sont disponibles (section III). Cette technologie a ensuite été transposée vers les deux génotypes d'étude du CpGV (objet principal), CpGV-M et CpGV-R5 (section IV).

Pour faciliter la transposition du système ANCHORTM dans d'autres baculovirus, une seule cassette contenant les deux composants, OR-FP et ANCH, a été insérée dans le plasmide. Cette cassette ANCHORTM est encadrée par deux régions virales permettant la recombinaison avec le génome viral. Ainsi les virus AcMNPV-ANCHOR3, AcMNPV-ANCHOR1, CpGV-M-ANCHOR3 et CpGV-R5-ANCHOR1 ont été produits. Comme le génome du baculovirus est étroitement associé à la protéine basique P6.9 et qu'il est occlus dans la nucléocapside constituée principalement de VP39 [91,98], il était important d'évaluer si la présence des nombreuses protéines OR-FP interférerait avec l'assemblage du virus et donc avec l'infectivité du virus. En outre, la capacité de ces particules remplies de protéines OR-FP à s'occlure dans les OB, nécessitait des tests spécifiques.

Nous avons donc étudié l'ensemble des caractéristiques biologiques et structurales du premier virus construit, AcMNPV-ANCHOR3 (section III.2).

En microscopie électronique à balayage, aucune différence n'a été observée entre AcMNPV-ANCHOR3 et le virus sauvage AcMNPV-Wt ; que ce soit au niveau des nucléocapsides ou sur la structure globale de l'OB (Figure 23). L'infectivité des virus recombinants a été testée à la fois pour les BV en culture cellulaire et pour les OB dans les larves, sur une infection *per os* à l'aide de *Spodoptera exigua*. Une légère diminution du titre final obtenu en culture cellulaire a été observée (Figure 25). Le virus recombinant AcMNPV-ANCHOR3 semble être stable, au moins pendant six passages successifs *in vitro* ; ce qui suggère que les séquences bactériennes (parABS) ne souffrent pas d'une forte contre sélection chez les insectes (Tableau 7). Ces résultats en confirment d'autres, montrant qu'une amplification 10⁹ d'un HCMV-ANCHOR entraîne toujours la production de 93% des virus marqués par ANCHORTM *in vitro* [279].

AcMNPV-ANCHOR3 a été utilisé pour suivre le cycle d'infection dans les cellules Sf9. La taille du BV, 200 nm par 100 nm, est trop petite pour être résolue par microscopie optique. Cependant, l'intensité

de la fluorescence d'une seule particule est suffisante pour être détectée, comme un seul pixel par microscopie à fluorescence. Il a été possible de suivre le premier contact avec la cellule et l'internalisation de la particule virale. Au début de l'infection, le développement du stroma viral peut être observé comme une fluorescence diffuse, suivie rapidement par des zones plus intenses, correspondant probablement aux viroplasmes. Sur le modèle BmMNPV, le nombre de points de réplication de l'ADN serait d'environ 15 [294]. On observe le même ordre de grandeur (variable en fonction des cellules) (Figure 27). À la fin de l'infection, de nombreux points lumineux, qui correspondent aux OB, remplissent le noyau entier de la cellule infectée. Il convient de noter qu'il existe une fluorescence en dehors de ces OB, confirmant que l'ADN du baculovirus est présent sous forme libre dans le noyau, comme l'ont déjà observé Vanarsdall *et al.*, qui ont estimé que seulement 28 % environ de l'ADN viral synthétisé était encapsulé dans les OB [295]. Le « halo vert » dans le cytoplasme est dû à la réflexion de la fluorescence du noyau et non à un niveau élevé de OR3-GFP dans le cytoplasme. En fait, la quasi-totalité des OR3-GFP est transloquée dans le noyau. La linéarité, entre le niveau de fluorescence et le titre BV, suggère que toutes les particules virales sont également couplées à la protéine OR3-GFP (Figure 28).

Les deux virus AcMNPV-ANCHOR3 et AcMNPV-ANCHOR1 ont servi à infecter des cellules Sf9. Ces infections ont permis d'observer : des infections simples, de l'un ou l'autre des deux virus (Figure 29), mais également des coinfections d'une même cellule (Figure 30). Le nombre de cellules coinfectées augmente en même temps que la MOI. De plus, comme observé par Beperet *et al.*, ces infections multiples sont réalisables avec un temps d'inoculation différé entre les deux virus (testé ici jusqu'à 4 heures) [130].

La transposition du système ANCHORTM aux virus CpGV-M et CpGV-R5 a pu être réalisée, mais l'absence de cultures cellulaires a rendu plus longue et difficile l'obtention de ces virus recombinants. Les virus recombinants ne sont pas suffisamment purs (contamination avec les virus de phénotype sauvage) et n'ont pas pu être utilisés tels quels pour les expériences de coinfection *in vivo*; ils sont encore en cours de purification (section IV). Les premières observations de CpGV-M-ANCHOR3 et CpGV-R5-ANCHOR1 en microscopie montrent que ces virus recombinants possèdent les mêmes caractéristiques que celle de AcMNPV-ANCHOR (Figure 33).

En conclusion, il a été possible d'adapter le système ANCHORTM aux baculovirus. Par le marquage de l'ADN du virus dès sa synthèse, il a été possible de suivre une particule virale en temps réel dans une cellule infectée ou dans une larve entière. Cette approche ouvre la voie, par exemple, à l'étude des points clés impliqués dans la résistance des insectes, mais également, à l'étude des infections multiples.

CHAPITRE 4² : DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES GÉNOTYPES DE CpGV IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE DE TYPE I PAR QPCR ET HRM

I. INTRODUCTION

Les infections multiples jouent un rôle crucial dans les populations naturelles. Elles peuvent être une issue pérenne pour endiguer les problèmes d'émergence de nouvelles résistances de *Cydia pomonella* ([Chapitre 1](#)). L'analyse d'OB, extraits d'une seule larve collectée sur le terrain, a révélé la présence de plusieurs génotypes différents, et donc d'une infection mixte [\[181\]](#). Connaître la fréquence de ces infections chez les larves individuelles et la proportion relative de chaque génotype co-infectant, est important pour concevoir des stratégies de lutte biologique plus efficaces. Ce chapitre est consacré au développement d'une méthode pour détecter et discriminer deux génotypes, l'un appartenant au groupe A (CpGV-M, bloqué par la résistance de type I) et l'autre au groupe E (CpGV-R5, contourne cette résistance). Ce sont les principaux composants de la Carpovirusine[®] Evo2. Cette méthode a été développée pour l'analyse de l'infection au niveau d'un individu et permet de déterminer la fréquence d'apparition des infections multiples dans une population. Elle pourrait être généralisée à d'autres génotypes, en trouvant les amorces appropriés.

La détection de chaque génotype a été réalisée par amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*) d'une région cible, suivi par une caractérisation HRM (*High Resolution Melting*) des amplicons produits. La PCR est une technique d'amplification en très grande quantité d'une région cible, grâce à différents cycles de chauffage. Elle est composée de 3 étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation ([Figure 35](#)) de l'ADN ; chaque cycle est répété n fois (en général 30 à 40

² Des parties de ce chapitre ont été publiées dans l'article : Hinsberger, A.; Theulier Saint Germain, S.; Guerrero, P.; Blachère-López, C.; López-Ferber, M.; Bayle, S. A Combination of Real-Time PCR and High-Resolution Melting Analysis to Detect and Identify CpGV Genotypes Involved in Type I Resistance. *Viruses* 2019, 11, 723.

fois). Dans un premier temps, le milieu réactionnel est chauffé, ce qui dénature l'ADN (ADN double brin à simple brin). Ensuite, les oligonucléotides d'ADN homologues, appelés amorces, vont s'hybrider par complémentarité sur la région d'intérêt. La polymérase, à l'origine de la réplication de l'ADN, amplifie les fragments dans le sens 5' vers 3', pour former un amplicon. Il est dupliqué en théorie 2^n copies (dépendant du nombre de cycles). Les réactifs de la qPCR contiennent en plus un agent intercalant, tel que le EvaGreen® : (PCR quantitative, pour plus de détails voir la vidéo de New England Biolabs [296]). Celui-ci fluoresce lorsqu'il est couplé à de l'ADN double brin (ADNdb). En mesurant la fluorescence, il est possible de quantifier les néo-brins synthétisés au cours de chaque cycle PCR.

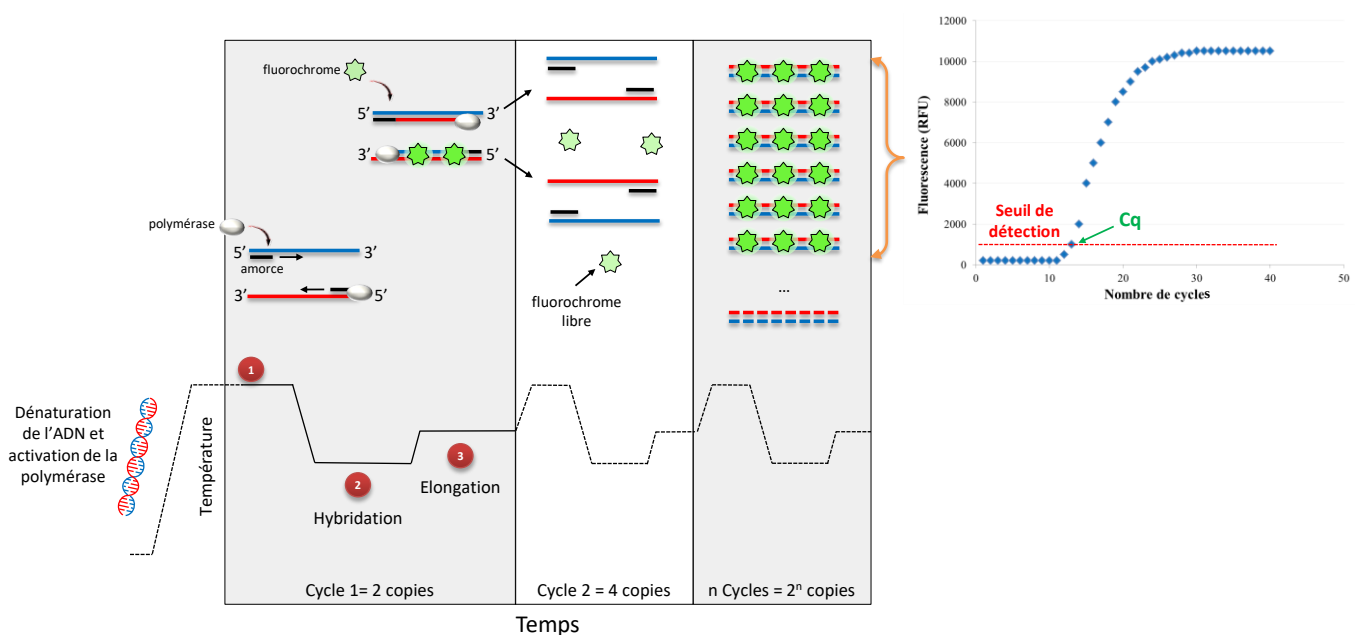


Figure 35 : Principe de la qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Adapté à partir de [297].

Le marqueur spécifique de chaque isolat choisi pour être amplifié par PCR, est le gène *pe38*. Il a été démontré qu'une modification de l'ORF24 (gène *pe38*) sur le virus, est associée à sa capacité à se répliquer chez les insectes porteurs de la résistance de type I [183]. Sur ce gène l'isolat CpGV-M présente une insertion de 24 bp (acides aminés DTVD), par rapport aux isolats capables de contourner cette résistance (CpGV-R5, -E2, -I12, -S) (Figure 36). Le séquençage du génome de CpGV-R5 a montré d'autres différences avec CpGV-M, mais leurs rôles dans le contournement de la résistance n'ont pas été prouvés.

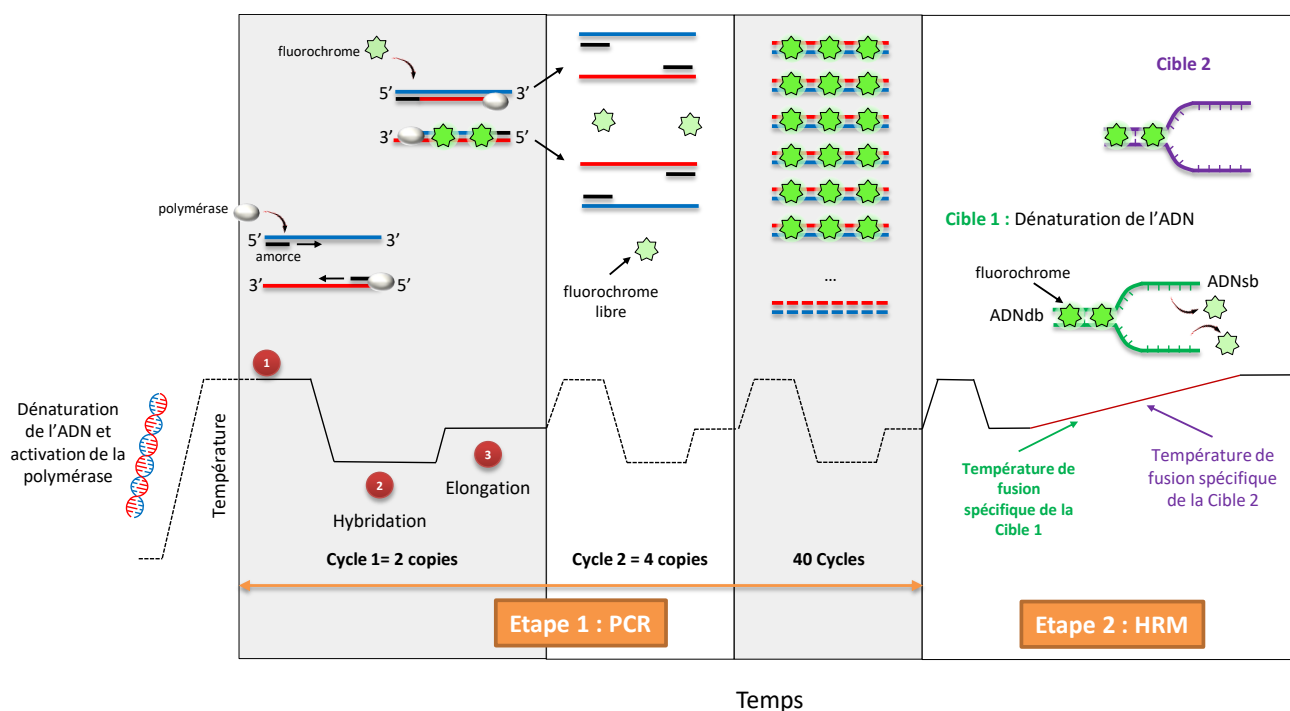


Figure 37 : Principe de la HRM. ADN double (ADNdb), ADN simple brin, (ADNsb).

Dans ce chapitre, la méthode HRM a été adaptée sur plusieurs matrices : une gamme standard établie à partir de différents mélanges de CpGV-M et CpGV-R5 et de deux morphotypes baculoviraux. Ces deux morphotypes sont le virus bourgeonné (BV), impliqué dans l'infection systémique (infection de cellule à cellule) et le virus occlus dans une matrice protéique, le corps d'occlusion (OB) qui permet la survie dans l'environnement et est responsable de la transmission entre hôtes ([Chapitre 1](#)).

II. DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE HRM

II.1. Mélanges viraux et établissement d'une gamme standard

La quantité d'ADN viral des isolats 2020-s1 (CpGV-M) et 2016-r16 (CpGV-R5) a été déterminée par qPCR pour ajuster précisément les proportions relatives des deux génotypes. Chaque mélange a été identifié par les proportions relatives de chaque génotype, « M_i » et « R_j », i étant la fréquence de CpGV-M et j étant la fréquence de CpGV-R5 de l'inoculum ([Tableau 9](#)). Chaque mélange a été analysé par HRM ([Figure 38](#)), puis a servi de gamme standard pour la suite des expériences ([Figure 39](#) et [Figure 40](#)).

Tableau 9 : Mélanges CpGV-M et CpGV-R5 utilisés comme gamme standard et comme inoculum.

Mi et Rj	Proportion de CpGV-M (%)	Proportion de CpGV-R5 (%)
M99-R1	99	1
M95-R5	95	5
M90-R10	90	10
M75-R25	75	25
M50-R50	50	50
M25-R75	25	75
M10-R90	10	90
M5-R95	5	95
M1-R99	1	99

Les larves ont été infectées individuellement par ces mélanges. La descendance de ces mélanges viraux a été analysée sur les différents morphotypes viraux (BV ou OB). Le processus d'extraction des différentes particules virales a été adapté ([Chapitre 2](#)). Une fois l'ADN extrait, celui-ci a été purifié de la même manière (indépendamment de la matrice) à l'aide d'un mini kit ADN QIAamp® (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions recommandées.

II.2. Infections virales de CpNPP avec des mélanges et extraction des néo-BV

Les larves de CpNPP ont été infectées individuellement par des mélanges de OB : (M0-R100), (M25-R75), (M50-R50), (M75-R25) et de (M100-R0). 72 h après l'inoculation, les larves ont été lavées dans du SDS à 0,1 % et rincées deux fois dans de l'eau distillée. L'hémolymphe de chaque larve, désignée par H(Mi-Rj), a été récupérée individuellement avec une fine pipette pasteur. Deux larves de chaque inoculum ont été choisies au hasard et ont été analysées. Les courbes de fusion ont été comparées à la gamme standard ([Figure 41](#) et [Figure 42](#)).

II.3. Infections virales de CpNPP avec des mélanges de génotypes et analyse des OB produits

Quatre jours après l'infection, les larves malades ont été broyées et filtrées collectivement. Les OB produits par ces infections ont été nommés P(Mi-Rj). Les OB résultants ont été analysés par qPCR et HRM. Les courbes de fusion ont été comparées à la gamme standard ([Figure 43](#) et [Figure 44](#)).

II.4. qPCR et HRM

Les amorces ([Chapitre 2](#)) ont été conçues pour cibler la région variable de l'ORF 24, le gène *pe38*, et ainsi englober la délétion de 24 bp. Les amplicons résultants pour CpGV-M et CpGV-R5 mesurent 121 et 97 bp respectivement. Chaque qPCR a été réalisée en triplicat. Les mélanges réactionnels et les cycles de qPCR et HRM sont présentés dans le [Tableau 10](#). Les amplicons PCR obtenus ont été séquencés ([Chapitre 2](#)).

Tableau 10 : Mélanges réactionnels et cycles de qPCR et HRM.

Mix PCR
200 nM de chaque amorce (Chapitre 2)
4 µL de 5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix (sans ROX) (Solis Biodyne)
5 µL d'ADN viral
Eau distillée QSP 20 µL

Programme du thermocycleur		
Programme qPCR		
Activation Taq polymérase	90°C	15 min
Dénaturation	95°C	15 s
Appariement	55°C	40 s
Extension	72°C	30 s
40 cycles		
Programme HRM		
95°C	5 s	
50°C	10 s	
Augmentation de la température de 70 à 90°C par étapes de 0,2°C et maintien 10 secondes pour chaque palier		

III. RÉSULTATS

III.1. Identification et quantification des génotypes dans un mélange

Les ADN des virus purs CpGV-M et CpGV-R5, annotés (M100-R0) et (M0-R100), ont été utilisés comme références ([Figure 38a](#)). Ces ADN sont dilués de log en log afin d'établir une droite d'étalonnage ([Figure 38b](#)). Leur efficacité était d'environ 91 et 93 % respectivement. En théorie, une séquence cible peut doubler à chaque cycle (efficacité de 100%). On considère qu'une efficacité est acceptable entre 90 et 110%. Ces efficacités étaient suffisamment proches l'une de l'autre pour permettre la quantification de chaque génotype dans un mélange ([Figure 38](#)). La valeur du y-intercept (y-int) était de 38 (valeur à partir de laquelle on considère une amplification comme aspécifique). Tous les témoins négatifs (NTC) ont obtenu une valeur de cycle de quantification (Cq) supérieure à l'y-

intercept (supérieur de 5 Cq). Les amplifications supérieures à cette valeur correspondent à des amplifications non spécifiques dues à la formation de dimères en fin du cycle. Par conséquent, ils peuvent être exclus de l'analyse. Deux autres témoins négatifs ont été ajoutés : une larve non infectée et un baculovirus appartenant à une autre famille : AcMNPV1.2. Ces témoins se sont comportés comme les NTC, aucune amplification spécifique n'a été observée.

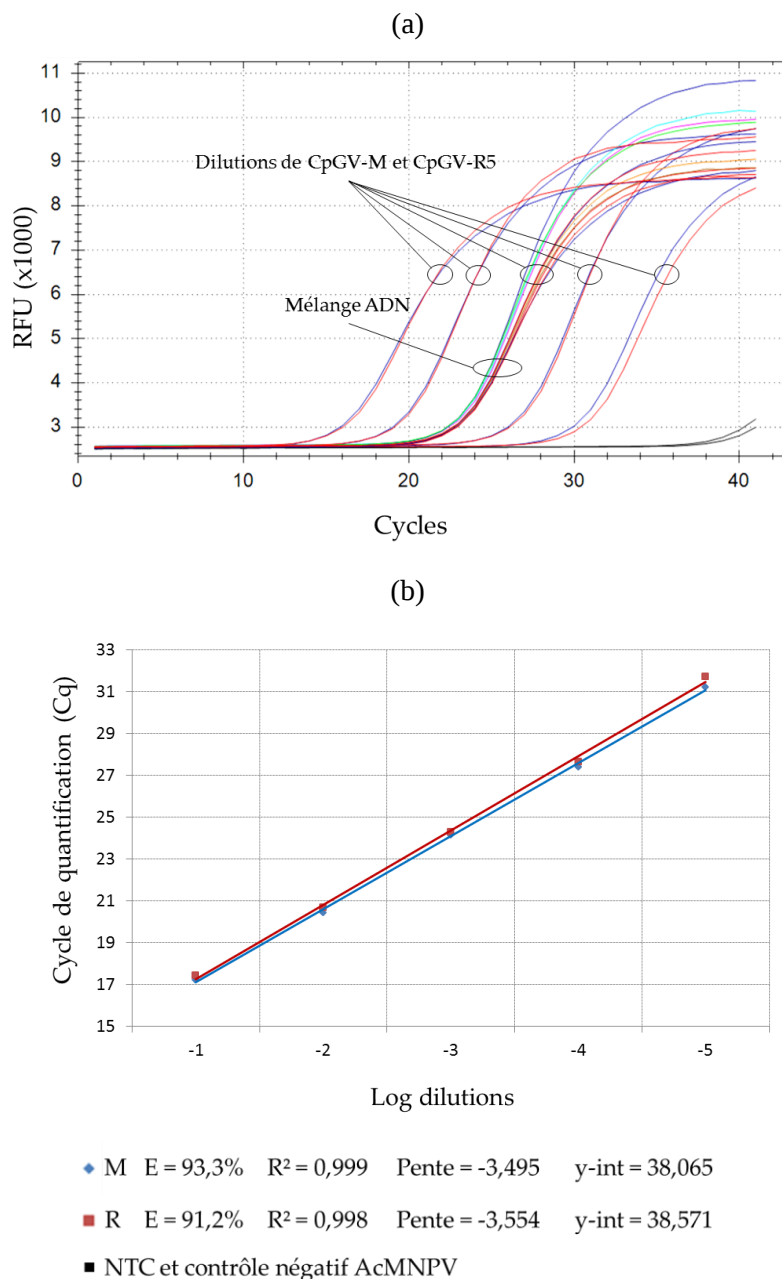


Figure 38 : Courbes d'amplification PCR de la gamme standard (a) Unité de fluorescence relative (RFU) en fonction du nombre de cycles PCR. (b) Cycle de quantification (Cq) en fonction des dilutions de CpGV-M et le CpGV-R5. L'efficacité (E), le coefficient de corrélation (R²) et l'ordonnée à l'origine (y-int) sont indiqués pour les références : CpGV-M pur et CpGV-R5 pur.

Les amplicons de CpGV-M (M100-R0) et de CpGV-R5 (M0-R100) ont été vérifiés par séquençage. La même délétion de 24 bp décrite par Gebhardt *et al.* [183] a été observée entre les amplicons CpGV-M et CpGV-R5.

Le génotype pur CpGV-R5 (M0-R100) (Température moyenne de fusion, $T_{f_m} = 80,80$, $\sigma = 0,00$), et le génotype pur CpGV-M (M100-R0) ($T_{f_m} = 82,13$, $\sigma = 0,12$) présentent des pics uniques. Les pics des mélanges d'ADN (M100-R0 ; M99-R1 ; M95-R5 ; M90-R10 ; M75-R25 ; M50-R50 ; M10-R90 ; M25-R75 ; M5-R95 ; M1-R99 et M0-R100) sont encadrés par ceux des dilutions virales de référence. Leurs courbes de fusion sont présentées dans la Figure 39. Les populations mixtes présentent deux pics correspondant aux génotypes CpGV-M et CpGV-R5 avec une intensité différente selon les proportions de chaque génotype.

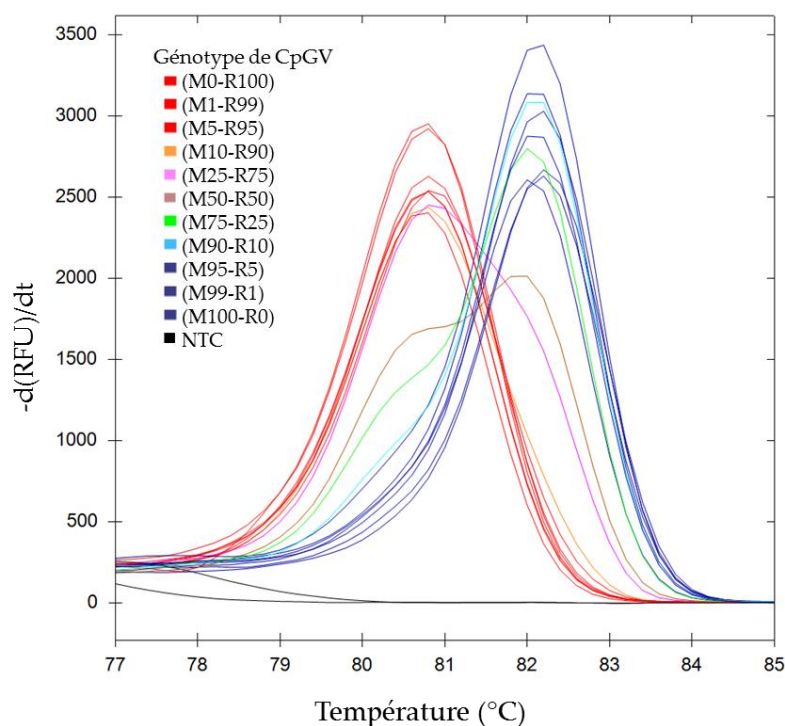


Figure 39 : Courbes de fusion des amplicons de la gamme standard. Le graphique représente la dérivée de la RFU en fonction de la température : (■) (M0-R100), (M99-R1), (M95-R5) ; (■) (M100-R0), (M1-R99), (M5-R95) ; (■) (M90-R10); (■) (M75-R25) ; (■) (M50-R50) ; (■) (M25-R75) ; (■) (M10-R90).

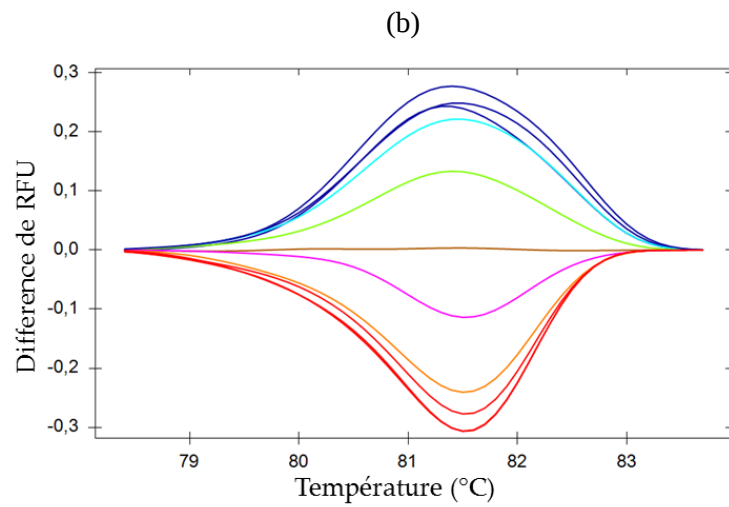
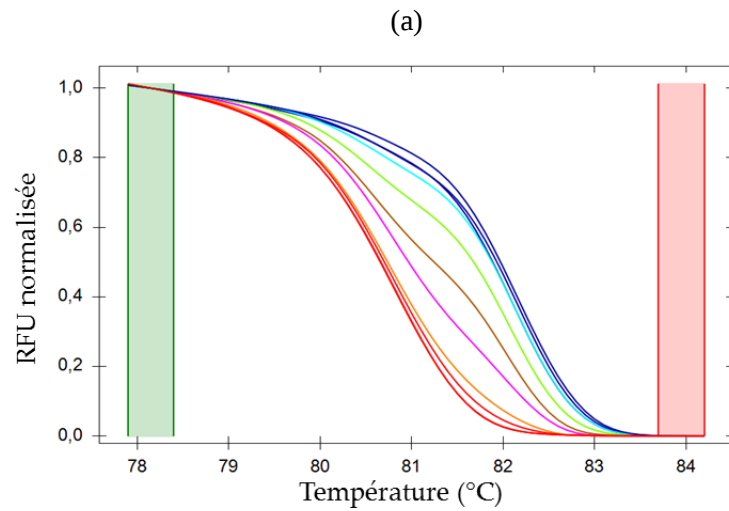
Les génotypes ont été regroupés automatiquement en groupes de profils par le logiciel Precision Melt AnalysisTM. Chaque couleur représente un groupe. L'intensité de la fluorescence présentée dans la Figure 39, est normalisée et réduite (valeurs comprises entre 0 et +1) en utilisant des valeurs avant

et après la phase de fusion. Le logiciel clustérise chaque échantillon en calculant sa probabilité d'appartenir à un groupe en fonction de son écart-type et de sa courbe de fusion moyenne [303].

Les 11 échantillons sont regroupés en 7 clusters (Figure 40). La Figure 40a représente ces données normalisées. Pour améliorer la représentation des résultats, une valeur de référence (50/50) est utilisée et soustraite des valeurs normalisées de chaque échantillon. Ces courbes de différences sont tracées en Figure 40b et utilisées pour identifier chaque cluster [303]. Les différences extrêmes sont celles des génotypes purs.

Dans les populations mixtes, lorsque la fréquence d'un des génotypes est inférieure à 10%, le logiciel le regroupe avec le génotype pur majoritaire correspondant (même couleur). Le pourcentage de confiance représente la probabilité relative pour un échantillon d'appartenir à un groupe et est représenté dans la Figure 40c. La confiance de regroupement est plus faible dans les échantillons qui sont associés à tort.

Du côté positif de l'axe des ordonnées (axe y), les mélanges avec le génotype CpGV-M prédominant sont tracés ; du côté négatif de l'axe, ceux avec le génotype CpGV-R5 majoritaire, avec les génotypes purs (M100-R0) et (M0-R100) aux extrémités. L'étendue des courbes de différence est proportionnelle à la fréquence des génotypes dans les mélanges. Ces mélanges sont utilisés comme gamme standard dans l'estimation des proportions relatives de chaque génotype dans les infections virales.



(c)

Cluster							
Echantillons	(M0-R100)	(M10-R90)	(M25-R75)	(M50-R50)	(M75-R25)	(M90-R10)	(M100-R0)
Pourcentage de confiance	99,7%	99,9%	99,9%	99,9%	100,0%	81,0%	98,6%
Echantillons	(M5-R95)						(M95-R5)
Pourcentage de confiance	97,7%						97,8%
Echantillons	(M1-R99)						(M99-R1)
Pourcentage de confiance	99,8%						99,7%

Figure 40 : Courbes de fusion normalisées et regroupées de la gamme standard. (a) RFU normalisée en fonction de la température (b) Dérivée de la RFU par rapport à (M50-R50) utilisée comme référence avec des températures variables (c) Pourcentage de confiance pour chaque groupe :  (M0-R100), (M99-R1), (M95-R5);  (M100-R0), (M1-R99), (M5-R95) ;  (M90-R10) ;  (M75-R25) ;  (M50-R50) ;  (M25-R75) ;  (M10-R90).

III.2. Analyse des BV extraits de l'hémolymph

Les larves ont été nourries avec différents inoculums de mélanges d'OB. Les hémolymphes de ces larves ont été collectées individuellement pour l'analyse des BV. Des amplifications par PCR ont été réalisées comme précédemment. Deux larves choisies au hasard ont été analysées pour chaque condition. Les échantillons obtenus et analysés à partir de cette infection sont désignés par : H(M100-R0) et H(M0-R100) pour les inoculum purs et H(M90-R10) ; H(M75-R25) ; H(M50-R50) ; H(M10-R90) et H(M0-R100) pour les inoculum mixtes. Les courbes de fusion sont présentées dans la [Figure 41](#).

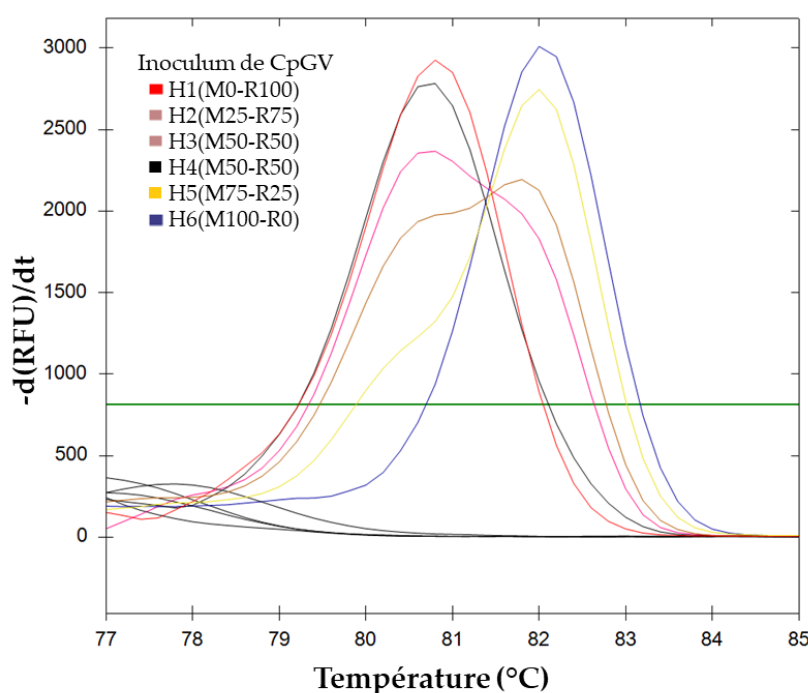
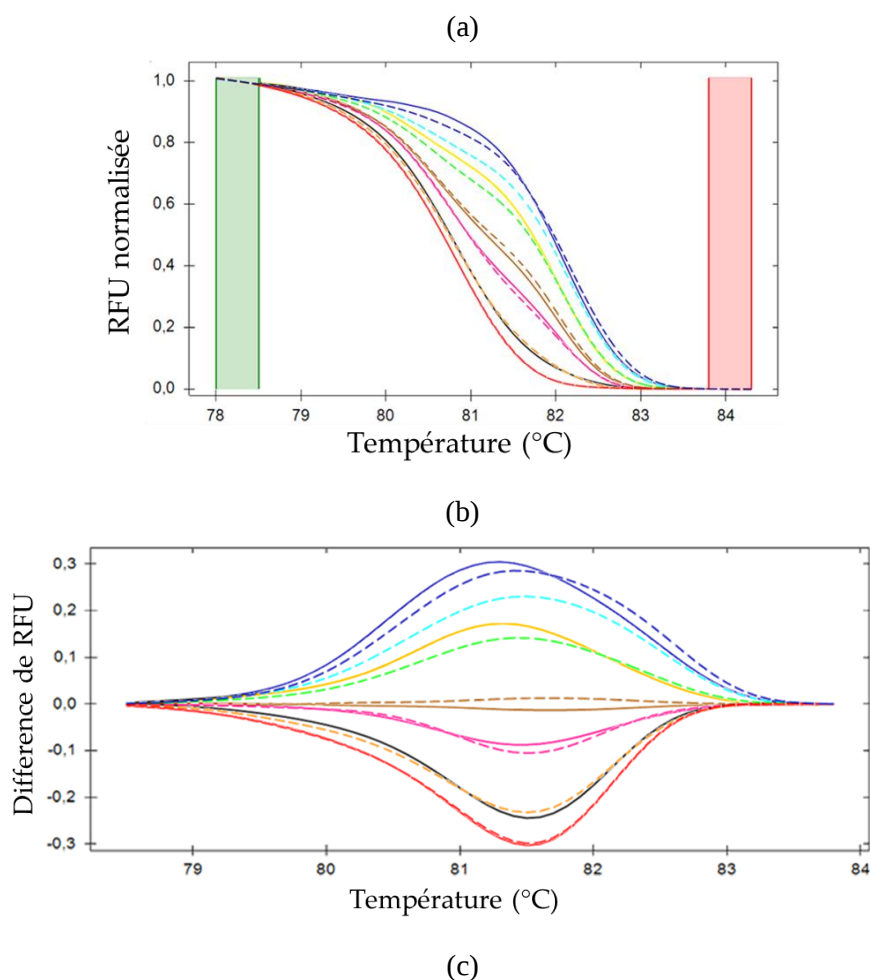


Figure 41 : Courbes de fusion des amplicons des BV obtenus sur des larves individuelles dans des conditions d'infection mixte : (■) H1(M0-R100) ; (■) H2(M25-R75) ; (■) H3(M50-R50) ; (■) H4(M50-R50) ; (■) H5(M75-R25) ; (■) H6(M100-R0).

Les courbes de fusion de ces échantillons ont été comparées à la gamme standard obtenue précédemment en [Figure 41 \(III.1\)](#) ([Figure 42](#)). Les échantillons inconnus sont représentés par des lignes pleines, tandis que ceux de la gamme standard sont représentés par des pointillés. Comme attendu H1(M0-R100) et H6(M100-R0) ont été associés dans le même cluster que CpGV-M et CpGV-R5 de la gamme standard.

Parmi les deux échantillons H(M25-R75), un seul a produit une amplification et n'est pas clustérisé avec le (M25-R75) parental. Le résultat de chaque infection individuelle révèle la proportion de virus réellement présente dans l'hémolymph. Cette proportion est le résultat de l'échantillonnage

des OB fait par la larve lors de l'ingestion, plus tout le processus d'infection. Les deux larves inoculées avec (M50-R50) montrent des tendances opposées. Dans une, une proportion plus importante de CpGV-M ; dans l'autre, de CpGV-R5. En contraste, les deux larves H(M75-R25) se trouvent dans le même groupe.



Cluster									
Gamme standard	(M0-R100)	(M10-R90)	(M25-R75)	(M50-R50)		(M75-R25)		(M90-R10)	(M100-R0)
Pourcentage de confiance	97.6%	98.2%	99.5%	99.6%		98.2%		79.3%	97.8%
Echantillons	H1(M0-R100)		H2(M25-R75)	H3(M50-R50)	H4(M50-R50)		H5(M75-R25)		H6(M100-R0)
Pourcentage de confiance	97.9%		99.4%	99.1%	93.3%		98,10%		99.9%

Figure 42 : Courbes de fusion des BV normalisées et regroupées par rapport à la gamme standard. (a) RFU normalisée (b) Différence de RFU en fonction de la température. (■) (M50-R50) utilisé comme référence. Clusters de la gamme standard (lignes pleines) (■) (M0-R100) ; (■) (M100-R0) ; (■) (M10-R90) ; (■) (M25-R75) ; (■) (M50-R50) ; (■) (M75-R25) ; (■) (M90-R10). BV résultant de chaque inoculum : (■) H1(M0-R100) ; (■) H2(M25-R75) ; (■) H3(M50-R50) ; (■) H4(M50-R50) ; (■) H5(M75-R25) et (■) H6(M100-R0). (c) Pourcentage de confiance pour chaque échantillon d'appartenance à son cluster.

III.3. Analyse des productions d'OB

Les larves ont été nourries avec divers inoculums, y compris les génotypes purs, et les OB résultants P(Mi-Rj) ont été analysés par HRM. Les résultats obtenus pour les courbes de fusion de ces OB sont présentés à la Figure 43.

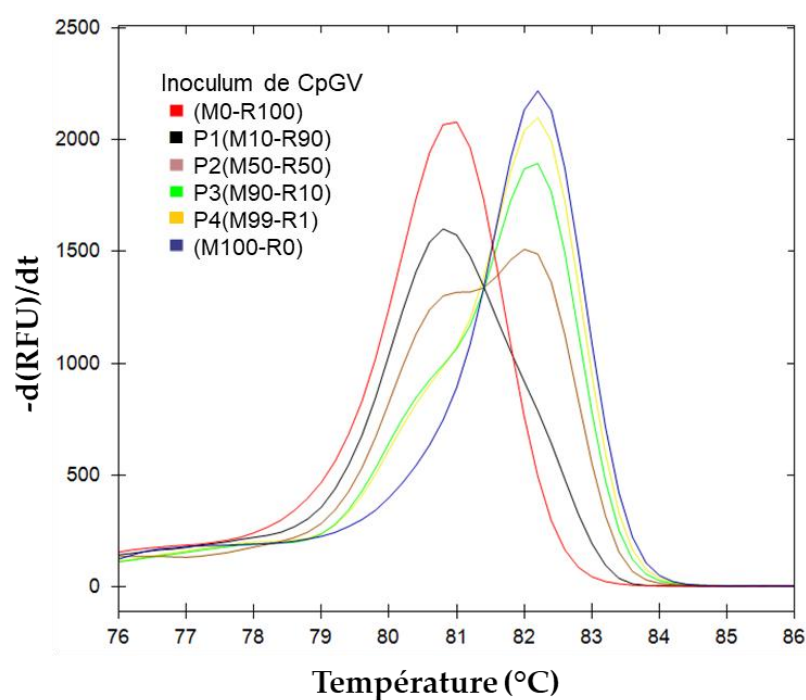


Figure 43 : Courbes de fusion des amplicons des OB obtenus sur des larves dans des conditions d'infection mixte. Dérivée de la RFU en fonction de la température. (■) (M0-R100) ; (■) P1(M10-R90) ; (■) P2(M50-R50) ; (■) P3(M90-R10) ; (■) P4(M99-R1) ; (■) (M100-R0).

L'analyse des données et le regroupement ont été effectués de la même manière que précédemment. Les échantillons inconnus sont représentés par des lignes pleines, tandis que la gamme standard est représentée par des pointillés (Figure 44). Les infections P(M50-R50) ont été associées dans les mêmes groupes que leurs inoculums parentaux. Les autres infections n'ont pas été regroupées avec leurs inoculums parentaux. P1(M10-R90) a été reconnu comme un nouveau groupe, il se situe entre (M10-R90) et (M25-R75) (plus proche de (M25-R75) de la gamme standard). P3(M90-R10) est associé à (M75-R25).

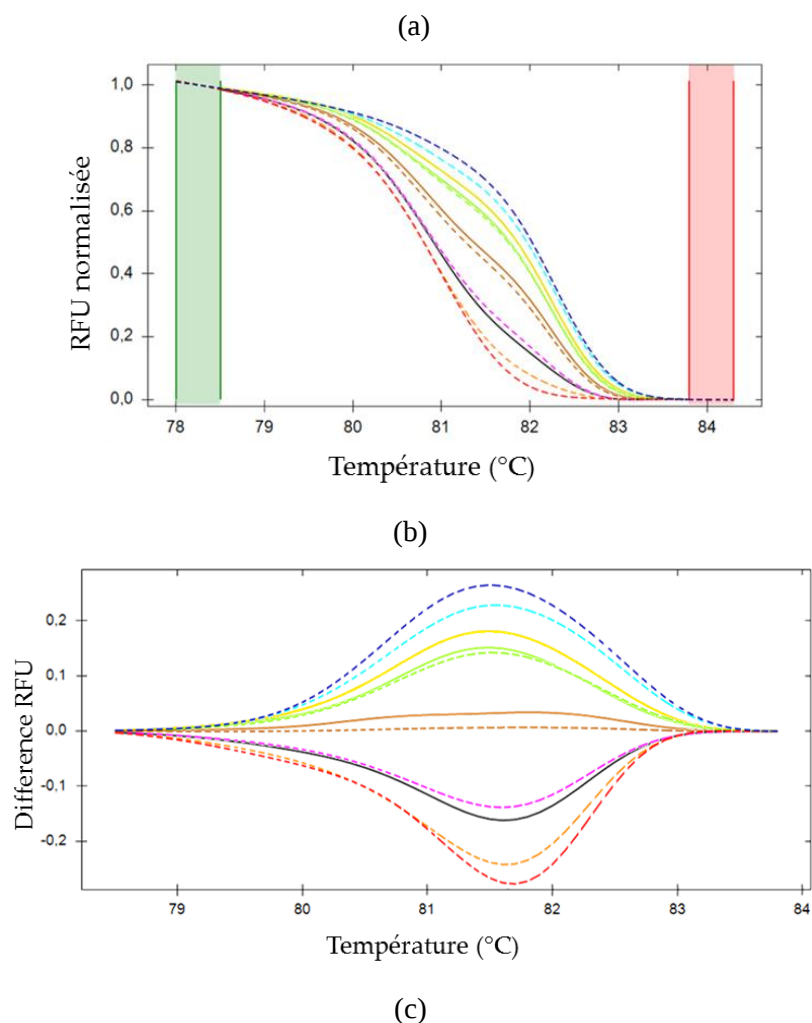


Figure 44 : Courbes de fusion des OB normalisées et regroupées par rapport à la gamme standard. (a) RFU normalisée en fonction de la température (b) Différence de RFU en fonction de la température. L'échantillon (■) (M50-R50) a été utilisé comme référence. Clusters de la gamme standard (lignes pleines) : (■) (M0-R100) ; (■) (M100-R0) ; (■) (M10-R90) ; (■) (M25-R75) ; (■) (M50-R50) ; (■) (M75-R25) ; (■) (M90-R10). OB résultants de chaque inoculum : (■) P1(M10-R90); (■) P2(M50-R50); (■) P3(M90-R10); (■) P4(M99-R1). (c) Pourcentage de confiance pour chaque échantillon d'appartenance à son cluster.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Le développement de la PCR et la précision croissante des systèmes d'analyse permettent aujourd'hui de détecter des mutations ponctuelles dans de courts fragments d'ADN. L'analyse HRM des amplicons est donc un moyen pratique de détecter de petites différences entre les séquences d'ADN, à condition d'utiliser des amorces suffisamment spécifiques.

La paire d'amorces a été conçue pour amplifier spécifiquement la région du gène *pe38*. D'après Gebhardt *et al.*, la différence de séquence du gène *pe38* entre les différents génotypes explique leurs différences de comportement vis-à-vis des insectes porteurs de la résistance de type I [183], même si celui-ci n'est probablement pas le seul gène impliqué dans la résistance de type I [277]. La différence principale entre le gène *pe38* du CpGV-M et celui de CpGV-R5 est une courte insertion de 24 bp dans le premier [183]. Les amplicons, qui résultent de l'amplification de la zone ciblée, mesurent respectivement 121 et 97 pb sur CpGV-M et CpGV-R5. Les températures de fusion moyennes (T_{f_m}) obtenues pour chaque génotype diffèrent de 1,3°C. Le système ayant une résolution de 0,15°C, il a donc été possible de résoudre les pics dans les échantillons de génotypes mixtes (Figure 39). Le poids final du pic dépend de la fréquence de la matrice et de l'efficacité de l'amplification pour chaque matrice. Nos conditions expérimentales ont été établies de telle sorte que les deux matrices s'amplifient avec une efficacité similaire (93,3 % et 91,2 % pour CpGV-M et CpGV-R5 respectivement) (Figure 38). En conséquence, l'importance de chaque pic est corrélée à la fréquence de la matrice ; ce qui permet d'estimer cette fréquence.

La capacité de la HRM à regrouper des échantillons (par rapport à la proportion de chaque génotype) a été vérifiée à l'aide de la gamme standard obtenue dans la partie (III.1). Cette gamme standard a été établie à partir de génotypes purs de CpGV-M et de CpGV-R5 et de mélanges de ces génotypes dans des proportions diverses (M100-R0, M90-R10, M50-R50, M10-R90, M1-R99 et M0-R100). Il a été possible de distinguer tous les mélanges sauf (M1-R99), (M5-R95) et (M0-R100) qui sont regroupés dans le même groupe (Figure 40). Grâce à cette approche, il a donc été possible de quantifier les proportions relatives de ces deux génotypes, sauf si la fréquence de l'un d'eux est inférieure à 10%.

Pour faciliter l'analyse, les résultats HRM peuvent être normalisés. Ceci permet de comparer les expériences. De plus, en traçant la différence de la courbe de fusion entière par rapport à (M50-R50), les groupes sont facilement identifiables (Figure 40b, Figure 42b, Figure 44b). La composition d'un échantillon inconnu se situe entre les échantillons de la gamme standard et permet ainsi d'estimer les fréquences des génotypes.

Le résultat de l'infection de larves se nourrissant d'un même mélange génotypique peut ne pas être identique aux génotypes parents. Deux autres tests ont été effectués pour compléter l'analyse : i) en

utilisant directement l'hémolymphe des larves infectées (analyse des BV), et ii) en utilisant les OB produits lors de ces infections.

L'hémolymphe de larves nourries avec le même inoculum de génotype mixte n'est pas toujours identique, comme le montre la [Figure 42](#) (Exemple : les deux larves nourries avec (M50-R50)). Cela reflète probablement la variabilité de l'alimentation (variabilité de l'échantillonnage) et de celle du développement de l'infection (variabilité de la sensibilité). Ces écarts pourraient également refléter une sélection en faveur d'un des génotypes ; bien qu'aucun avantage sélectif sur les caractères mesurés (production d'OB, infectiosité) n'ait été détecté [243]. En conséquence, lors de l'analyse de la progéniture des infections mixtes à base d'OB ([Figure 44](#)), des écarts par rapport aux ratios d'inoculation ont également été observés.

Cette approche a été appliquée pour surveiller la concentration et la dispersion virale dans des vergers traités ([Chapitre 5](#)).

Aujourd'hui, des populations de Cp porteuses de la résistance de type I sont présentes dans 7 pays d'Europe. Les pomiculteurs s'appuient sur l'analyse de la résistance effectuée sur des insectes en diapause, collectés l'année précédente, pour adapter leur stratégie de traitement. En plus d'être longue, cette approche ne peut être appliquée à chaque verger. Il est donc impossible d'évaluer le succès ou l'échec d'un traitement dans chaque champ à chaque génération. La détection des génotypes par qPCR/HRM pourrait permettre d'analyser plus facilement le statut d'infection des larves dans les vergers traités avec des produits à base de CpGV, permettant ainsi d'anticiper le succès ou l'échec du traitement à un stade précoce et offrant la possibilité au producteur d'utiliser des approches alternatives. Comme la répllication du CpGV-M seul est impossible chez les larves porteuses de résistance de type I, la proportion de larves négatives avec un test qPCR/HRM est une bonne estimation de la prévalence de cette résistance (dans un verger traité avec un produit contenant uniquement le CpGV-M). L'utilisation de ce test sur la descendance de larves diapausantes permettra d'orienter sur le type de produit à utiliser. À l'inverse, si des infections par le CpGV-M pur sont détectées après un traitement avec des produits contenant les deux génotypes, la prévalence de la résistance de type I ne peut être complète. Si aucune larve n'est infectée par le CpGV-R5 lors d'un traitement avec un mélange de génotypes, un nouveau type de résistance, bloquant spécifiquement les génotypes de type E, serait mis en évidence. Cette résistance, si elle pouvait exister, n'a pas encore été trouvée.

CHAPITRE 5³ : COMPARAISON DE LA DISPERSION ET DE L'OCCURRENCE DE CpGV ENTRE LABORATOIRE ET CONDITIONS NATURELLES

I. INTRODUCTION

Le carpocapse de la pomme (Cp), *Cydia pomonella*, est le principal ravageur des vergers de pommiers, poiriers et noyers en climat tempéré. Son cycle de vie et son nombre de générations (voltinisme) sont étroitement liés à la température. Dans le sud de la France, il y a traditionnellement 2 générations complètes et une troisième, qui autrefois n'était pas complète. Ces dernières années, la durée de la période chaude et le niveau des températures atteintes fait que la troisième génération devient un problème croissant [304]. Les larves fraîchement écloses se dirigent vers le fruit en mordant les feuilles et la surface des fruits c'est ainsi qu'elles ingèrent le virus [305] avant d'entrer dans le fruit [306]. La pénétration dans le fruit s'effectue sur un laps de temps court, entre 10 minutes et 24 heures après l'éclosion [307]. La majorité des œufs (90 %) sont pondus à moins de 10 cm du fruit et plus de 50 % des œufs sont pondus sur les feuilles près du fruit (variable au cours des générations) [308].

Le succès de la lutte biologique contre Cp, avec des produits commerciaux à base d'isolats de *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV), repose sur deux facteurs : l'ingestion d'une quantité suffisante de corps d'occlusion (OB) avant la pénétration dans le fruit et la réplique correcte du virus dans la larve. Des essais dans les pommeraies pour déterminer les doses appropriées à appliquer sur le terrain ont conclu que des doses de 9×10^{13} OB.ha⁻¹ permettent un contrôle presque total du carpocapse [309]. La réduction des doses (100 fois) n'a pas réduit de façon significative la mortalité dans les essais biologiques mais a entraîné une mort larvaire plus tardive et ainsi causé une augmentation rapide des dommages dus au Cp [310]. Les doses préconisées par les fournisseurs de bioinsecticides varient de 3×10^{12} à 1×10^{13} OB.ha⁻¹.

³ Des parties de ce chapitre ont été publiées dans l'article : Hinsberger, A.; Blachère-Lopez, C.; Lopez-Ferber, M. Promoting mixed genotype infections in CpGV: analysis on field and laboratory sprayed apple leaves. Biocontrol Sci. Technol. 2020, 1–8

La localisation de la ponte des femelles Cp dépend du développement des fruits. Les femelles sont attirées par des composés volatils de plante, et notamment le α -farnesene. La concentration dans l'air augmente avec la maturation du fruit, ce qui stimule la ponte [311]. Au cours de la première génération, les femelles pondent principalement leurs œufs dans la partie supérieure des feuilles (75 %), près des fleurs (18 %) [312]. Dans les générations suivantes, une partie au moins des œufs sont pondus sur le fruit ou sur le pédoncule et la proportion d'œufs pondus près des fruits augmente. Cela a pour effet de réduire la distance à parcourir pour les larves et donc diminue le temps d'exposition au virus. Ceci explique en partie pourquoi Burgerjon (1986) a observé que le CpGV contrôle mieux les premières générations d'insectes que les suivantes [313].

Le développement de la résistance à l'isolat CpGV-M, constitué presque exclusivement d'un seul génotype appartenant au groupe A, a motivé la recherche de nouveaux isolats capables de contrôler cette résistance. Cependant, ce phénomène de résistance suite à l'utilisation d'un isolat clonal a une probabilité élevée de se reproduire.

Malgré le développement d'isolats capables de contrôler la résistance, il est important de mettre en place une nouvelle stratégie de management contre ces ravageurs.

L'ingestion des deux virus CpGV-M et CpGV-R5 permet la réplication des deux génotypes, même dans des larves résistantes et un meilleur contrôle des insectes [243]. Ce constat d'une meilleure efficacité d'une population virale composée de multiples génotypes par rapport à des génotypes isolés a été fait pour d'autres espèces de baculovirus tels que SfMNPV [150,252] ou PhopGV [246,247] (Chapitre 1).

Aujourd'hui, la production commerciale de baculovirus pour la lutte biologique se fait majoritairement *in vivo* [314], même si il est possible de produire des baculovirus *in vitro* en utilisant des cultures de cellules d'insectes avec des bioréacteurs [282]. Les produits commerciaux comme Madex[®] Max ou Carpovirusine[®] Evo2 (Chapitre 1, Tableau 3), sont composés de plusieurs génotypes. Pour la Carpovirusine[®] Evo2 les principaux composants sont deux génotypes viraux : CpGV-M (groupe A) et CpGV-R5 (groupe E) (Figure 45).

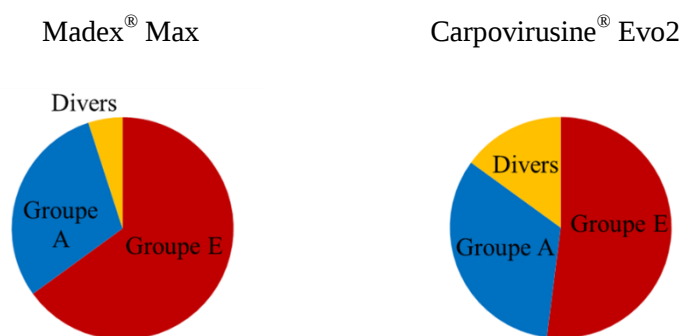


Figure 45 : Composition virale des produits commerciaux Madex[®] Max et Carpovirusine[®] Evo2 [315].

Aucune donnée n'a été recueillie concernant la quantité réelle de virus ingérée par les larves. Pourtant ces données sont nécessaires, afin d'améliorer la stratégie de traitement dans les vergers, puisque les infections mixtes CpGV-M et CpGV-R5 offrent une meilleure protection ([Chapitre 1](#)). Par ailleurs, la présence de plus d'un variant génotypique dans une seule larve Cp a déjà été observée dans la nature [\[181\]](#), mais la fréquence d'un tel évènement n'est pas connue.

Dans ce chapitre les différentes méthodes de dispersion, utilisées actuellement en verger, ont été comparées. À partir de ces premiers résultats, la probabilité de rencontre entre une larve et un virus a été modélisée en fonction du temps. Des infections larvaires ont été réalisées en laboratoire avec des feuilles artificiellement infestées, simulant les conditions en verger. Ainsi la mortalité a pu être analysée, tout en maîtrisant des paramètres abiotiques, tels que la concentration en surface et le temps d'infection. Dans un second temps, ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus à partir de feuilles recueillies après traitement en verger. Afin d'estimer l'occurrence de chaque génotype, que ce soit une infection simple ou multiple, chaque larve a été analysée individuellement par qPCR couplée à une HRM (techniques développées dans le [Chapitre 4](#)).

II. DISTRIBUTION DES PROBABILITÉS D'INFECTION

Ballard *et al.* (2000) ont analysé à la fois le nombre des morsures faites par des larves néonates Cp au cours du temps, et la surface de chacune de ces morsures ([Tableau 11](#)).

Tableau 11 : Nombre et taille des morsures de *Cydia pomonella* au cours du temps [306].

Temps (min)	Nombre de larves	Nombre de morsures/larve	Surface (mm ²)	σ (mm ²)
3,5	101	1	0,0099	-
7,5	91	1	0,0109	-
15,0	93	3	0,0322	0,0630
30	53	8	0,1509	0,0167
60,0	60	19	0,3167	0,0344

Nous avons effectué nos propres mesures avec des feuilles mordues par des larves. La surface moyenne d'un croc obtenue est d'environ 0,012 mm² ([Figure 46](#)). Ceci est en cohérence avec les résultats obtenus par Ballard *et al.* (2000). De même, des morsures en surface des feuilles sont retrouvées après seulement 3,5 minutes de contact avec les feuilles, et leur nombre et leur surface augmentent avec le temps. Dans les conditions décrites par Ballard à une concentration de $4,32 \times 10^3$ OB.cm⁻², le temps d'exposition nécessaire pour tuer 50% des larves (LET₅₀) est d'environ 60 min. On peut donc en déduire que la DL₅₀ est d'environ 14 OB. Cette DL₅₀ est supérieure à celle observée dans des travaux antérieurs

qui était estimée entre 1 et 5 OB [36,316]. En tenant compte de ces observations et en supposant une dispersion homogène des OB, une larve néonate ingérerait en moyenne 2,76 OB après seulement 3,5 minutes de contact avec les feuilles ou les fruits, et pourrait ingérer une centaine d'OB en moins d'une heure.

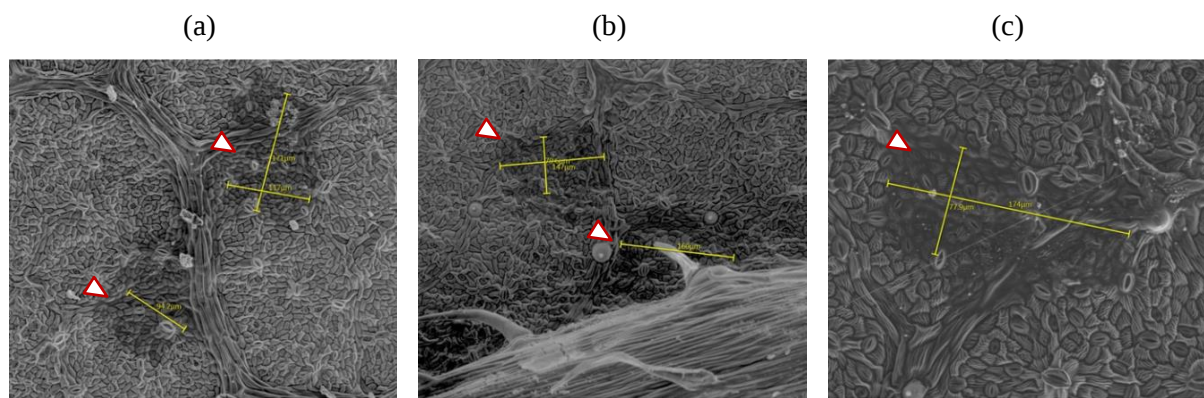


Figure 46 : Feuilles de pommier mordues en surface par une larve et observées par MEBE.

Un modèle a été construit à partir du comportement alimentaire des larves et de la composition génotypique de la Carpovirusine® Evo2 (CpGV-M:36%/CpGV-R5:64%) (Figure 47). Ce modèle présuppose que les larves mangent le virus d'une manière non spécifique en mordant la feuille. Il est basé sur une loi binomiale (dispersion homogène et aléatoire) avec une concentration virale théorique de $4,32 \times 10^3$ OB.cm⁻² (concentration estimée par Ballard *et al.* pour une vaporisation à 10^7 OB.mL⁻¹) en fonction du temps dépend d'exposition au virus qui dépend du nombre de morsures faites par une larve (Tableau 11).

La probabilité qu'une larve mange au moins 1 OB d'un des génotypes est représentée par des lignes pleines (bleu pour CpGV-M et rouge pour CpGV-R5). La probabilité d'infection suit une asymptote vers 100%. S'il y a plus d'un génotype viral, la probabilité d'infections multiples chez les hôtes pleinement sensibles sera le produit des probabilités de rencontrer chaque génotype (ligne en pointillée), et la probabilité d'infection par l'un ou l'autre, la somme de ces probabilités individuelles. Ce modèle ne prend pas en compte le génotype des larves, c'est-à-dire le fait que pour certaines larves le démarrage de l'infection dépend du génotype du virus ingéré, ou de la séquence d'ingestion (comme nous verrons dans le Chapitre 6). D'après ce schéma, la probabilité pour qu'une larve ait ingéré au moins 1 OB au bout d'une heure est de 100%. De même, la probabilité pour qu'une larve ait mangé les deux virus CpGV-M et CpGV-R5 est d'environ 80% en 30 minutes, et de presque 100% au bout d'une heure.

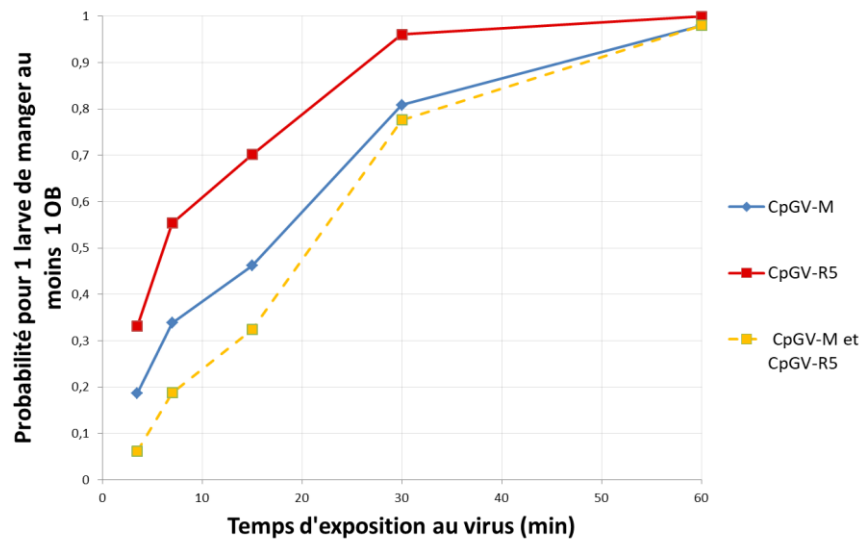


Figure 47 : Probabilité théorique pour une larve d’ingérer au moins 1 OB de CpGV-M et/ou CpGV-R5 en conditions agronomiques.

III. SIMULATION D’INFECTION DUE AU CPGV EN CONDITIONS DE LABORATOIRE

III.1.1. *Système de dispersion en laboratoire*

L’étude de la dispersion du CpGV a été réalisée à l’aide d’un nébuliseur et d’un système dispersif, pour permettre une diffusion en surface homogène et reproductible du virus [317]. Un nébuliseur est un appareil permettant de transformer à froid certains liquides en nuage de particules extrêmement fines. Le nébuliseur est placé sous une hotte fermée pour éviter les flux d’air qui peuvent perturber la dispersion homogène du brouillard (Figure 48). Dans la chambre de diffusion est introduit un mélange d’OB de CpGV à une concentration variable avec du colorant alimentaire E132 (pour vérifier la dispersion) pour un volume total de 5 mL (pour une diffusion optimale). En sortie du système, selon le besoin, des feuilles propres ou du milieu propre (milieux Stonefly *Heliothis*, Wards) sont placés en dessous comme réceptacle du virus.

Après nébulisation totale du liquide de la chambre (5mL), soit environ 1h, les feuilles ou le milieu nutritif sont récupérés pour infecter des larves néonates. La concentration obtenue en surface des feuilles ou du milieu a été étalonnée avec plusieurs tests de diffusion du colorant alimentaire et mesurée par densité optique. Ce pilote de dispersion viral nous permet de mettre en relation la quantité de virus nébulisé et la concentration de virus par unité de surface. Dans nos conditions, il nous permet d’obtenir 0,09% du nombre d’OB contenue dans la chambre par cm² sur le réceptacle.

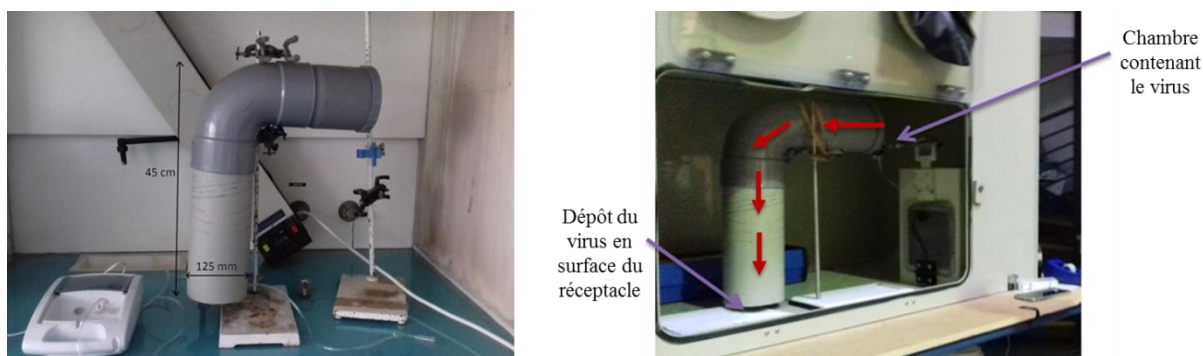


Figure 48 : Système de dispersion virale par nébulisation monté à l'IMT Mines Alès [317].

III.1.2. Larves nourries avec des feuilles pulvérisées avec CpGV en laboratoire

Les génotypes CpGV-M et CpGV-R5 purs ont été mélangés dans des proportions respectives de 36 % et 64 % et pulvérisés à des concentrations finales de $2,16 \times 10^4$; $2,16 \times 10^5$; $1,29 \times 10^6$ et $6,02 \times 10^6$ OB.cm⁻². Les larves néonates ont été placées sur des disques de feuilles (9,6 cm²) et ont été nourries pendant 10, 30, 60, 120 et 1140 minutes, puis elles ont été transférées sur des plaques à 24 puits remplies de milieux (Stonefly *Heliothis*, Wards) et incubées à 26°C pendant 72 hp.i. (heures post infection).

Dans un premier temps, afin d'éviter le biais que la résistance pourrait introduire, les expériences ont été menées en utilisant des larves sensibles au virus CpGV-M (CpNPP). Le statut d'infection des larves a été déterminé par analyse qPCR/HRM ([Chapitre 4](#)) et est détaillé dans la [Figure 49](#).

Le nombre de larves infectées augmente avec le temps d'exposition et la concentration du virus. L'apparition d'infections mixtes suit la même tendance. Si le temps d'exposition au virus est suffisamment long (1140 min), le nombre d'infections mixtes atteint 100%. De même, lorsque la concentration virale augmente suffisamment à la surface des feuilles, le taux d'infection augmente, jusqu'à atteindre 100% d'infection double. À $1,29 \times 10^6$ OB.cm⁻², 100 % des larves sont infectées quel que soit le temps d'exposition au CpGV et la proportion relative des infections mixtes augmente pour atteindre 100 % à la dose la plus élevée.

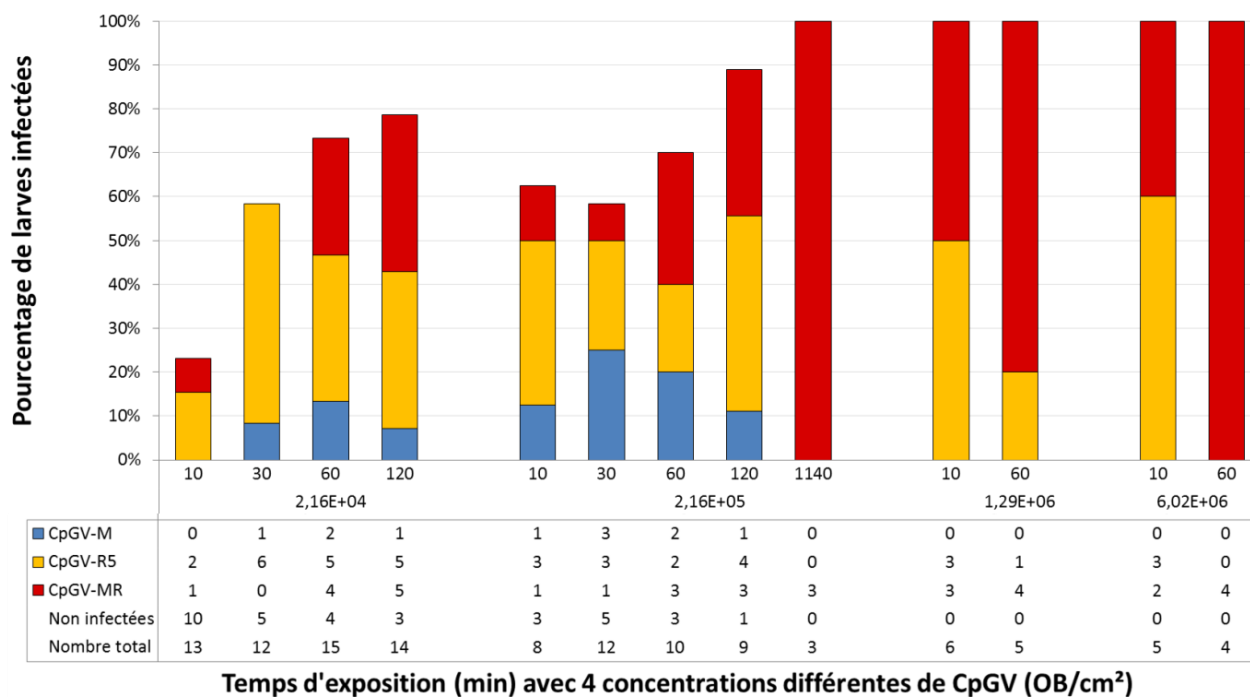


Figure 49 : Génotypes CpGV trouvés 72 hp.i. chez des néonates CpNPP infectées dans des conditions de laboratoire sur des feuilles infestées artificiellement. L'effectif est représenté dans le tableau sous le graphique.

La même expérience d'infection en laboratoire a été réalisée sur la population résistante au virus CpGV-M R_{GV} (Figure 50). Les résultats d'infections sont différents entre les colonies R_{GV} et NPP. Aucune infection CpGV-M seule n'a été détectée, ceci est cohérent avec la résistance spécifique portée par la population R_{GV} .

À une concentration de $2,16 \times 10^5 \text{ OB.cm}^{-2}$, le nombre de larves infectées par le virus CpGV-R5 augmente à mesure que le temps d'exposition augmente. 68 % d'infections simples ont été recensées après 2 heures d'exposition au virus et 71 % après 17 heures. Aucune double infection n'a été obtenue à cette concentration. La seule infection double obtenue à 10 minutes après infection doit être considérée comme une contamination.

À une concentration de $1,29 \times 10^6 \text{ OB.cm}^{-2}$, on observe la même tendance pour les infections simples CpGV-R5. En revanche des infections doubles sont obtenues après 1 heure d'exposition à la dose de $1,29 \times 10^6 \text{ OB.cm}^{-2}$.

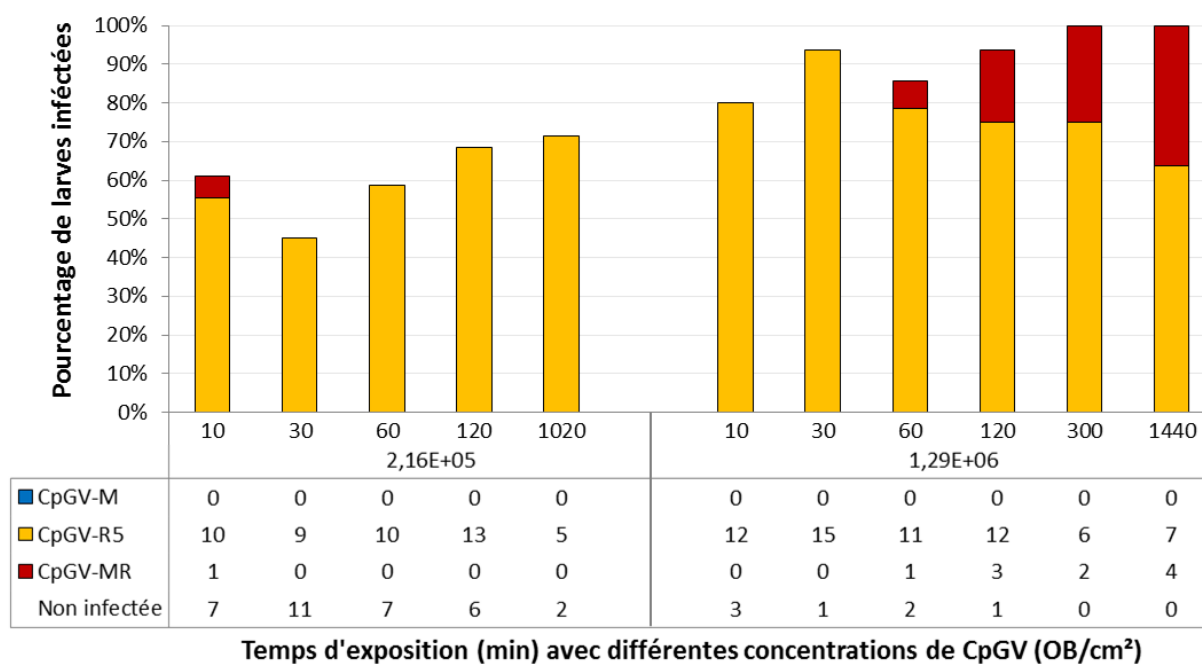


Figure 50 : Génotypes CpGV trouvés 72 hp.i. chez des néonates R_{GV} infectées dans des conditions de laboratoire sur des feuilles infestées artificiellement. L'effectif est représenté dans le tableau sous le graphique.

IV. CONDITIONS NATURELLES

IV.1. Terrain d'étude

Deux parcelles ont été étudiées (de mai à août) à Lamotte-du-Rhône (Vaucluse, France) et à Graveson (Bouches-du-Rhône, France), voir [Figure 51](#). Elles se situent à 60 km de distance l'une de l'autre, dans une région importante d'arboriculture fruitière : pêchers, amandiers, cerisiers, abricotiers, pommiers... Cette région est soumise à des vents violents (mistral) qui interviennent majoritairement en hiver et au printemps. Ces deux parcelles ont été étudiées car des échecs importants dans le contrôle des populations de *C. pomonella* ont été relevés. Dans ces parcelles, les populations de carpocapse sont importantes derrière les allées de cyprès (qui protègent du vent).



Figure 51 : Terrain d'étude de deux pomiculteurs (a) Lamotte du Rhône. Coordonnées GPS : 44°16'27.2"N 4°41'38.9"E (b) Graveson. Cordonnées GPS : 43°50'02.3"N 4°44'55.3"E. En rouge allée de cyprès. En bleu la parcelle utilisée comme terrain d'étude.

Les deux pomiculteurs utilisent des produits de biocontrôle à base de CpGV, et surtout la Carpovirusine® Evo2, répandus grâce à deux systèmes de pulvérisation différents : l'un à faible volume (300 L.ha^{-1}) et l'autre à moyen volume (500 L.ha^{-1}) (même quantité virale).



Figure 52 : Système de dispersion à petit volume (300 L.ha^{-1}) utilisé à Lamotte du Rhône.

Une première étude sur les ravageurs présents dans ces vergers a été effectuée. Les pommes qui présentent des piqures ont été récoltées. À l'intérieur, plusieurs larves d'insectes ont été trouvées (Figure 53). Ces larves ont été transférées sur du milieu (Stonefly Heliiothis, Wards) pour les identifier au stade adulte. 80% de ces larves sont des carpocapses du pommier. D'autres espèces de lépidoptères et de diptères ont été trouvées.

Carpocapse des pommes et des
poires



Espèces autres



Diptère attiré par la pourriture

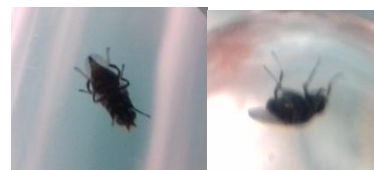


Figure 53 : Insectes présents dans les pommes piquées

Les analyses de la concentration et de la dispersion ont quant à elles été réalisées sur les feuilles récoltées immédiatement après le traitement. Pour cela, des feuilles ont été prélevées sur les pommiers à différentes hauteurs, à l'intérieur et à l'extérieur de la canopée. Ces feuilles infestées ont ensuite été découpées soigneusement et placées dans des boîtes de 20 cm². Des larves néonates (moins de 12h) ont été déposées sur la surface des feuilles et sont restées en contact pendant des durées variables (10, 30, 60, 120 et 300 minutes), puis elles ont été transférées sur des plaques à 24 puits remplies de milieux (Stonefly Heliiothis, Wards) pour un élevage individuel à 26°C pendant 72 hp.i.

IV.2. Comparaison entre les deux méthodes de dispersion du CpGV utilisées dans les vergers

La distribution des gouttelettes des produits a été comparée entre les deux méthodes de dispersion utilisées par les agriculteurs, à 10¹³ OB.ha⁻¹ selon les conditions recommandées par Arysta LifeScience, 2019. Les feuilles ont été récupérées et observées au microscope électronique à balayage environnemental (MEBE). Il n'est pas possible d'observer les OB à cause des adjuvants contenus dans les produits commerciaux. Aucun ruissellement n'a été observé sur les feuilles, même avec la dispersion de volume moyen. Les deux dispersions sont homogènes et recouvrent la totalité de la surface des feuilles (Figure 54).

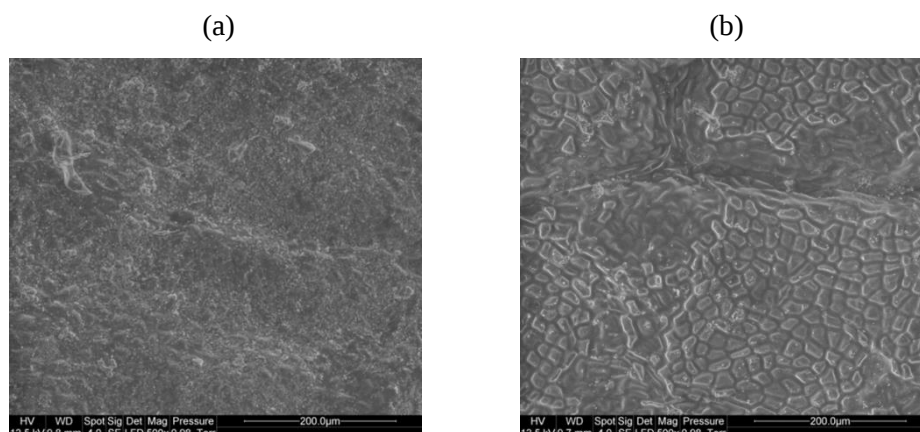


Figure 54 : Dispersion des biopesticides viraux sur feuilles de verger observée par MEBE. (a) Méthode de dispersion à faible volume (300 L.ha⁻¹) (b) Méthode de dispersion à volume moyen (500 L.ha⁻¹).

IV.3. Test d'infection avec des feuilles du verger

Des larves néonates sensibles au virus CpGV-M (CpNPP) ont été nourries avec des disques coupés (9,6 cm²) à partir de feuilles recueillies dans les vergers de pommiers, immédiatement après avoir été pulvérisées. L'infection à CpGV a été quantifiée par qPCR et HRM (Figure 55). Le nombre de larves infectées augmente avec le temps de contact. Après 30 minutes à se nourrir des feuilles infectées, près de 80 % des larves étaient infectées et 100 % l'étaient après 5 heures. La concentration virale est donc suffisante si les larves restent suffisamment longtemps à ramper et à manger avant d'entrer dans le fruit. C'est le cas de la 1^{ère} génération de Cp, mais ce ne sera peut-être pas le cas pour la 2^{ème} ou la 3^{ème} génération.

La fréquence des infections doubles augmente avec le temps de contact, après 30 min les deux génotypes sont détectés chez 26% des larves ; après 2 heures 42 % et 78 % après 5 heures. En comparant ces résultats avec ceux obtenus précédemment, la concentration virale trouvée à la surface des feuilles a été déduite et se situe certainement entre $2,16 \times 10^4$ et $2,16 \times 10^5$ OB.cm⁻².

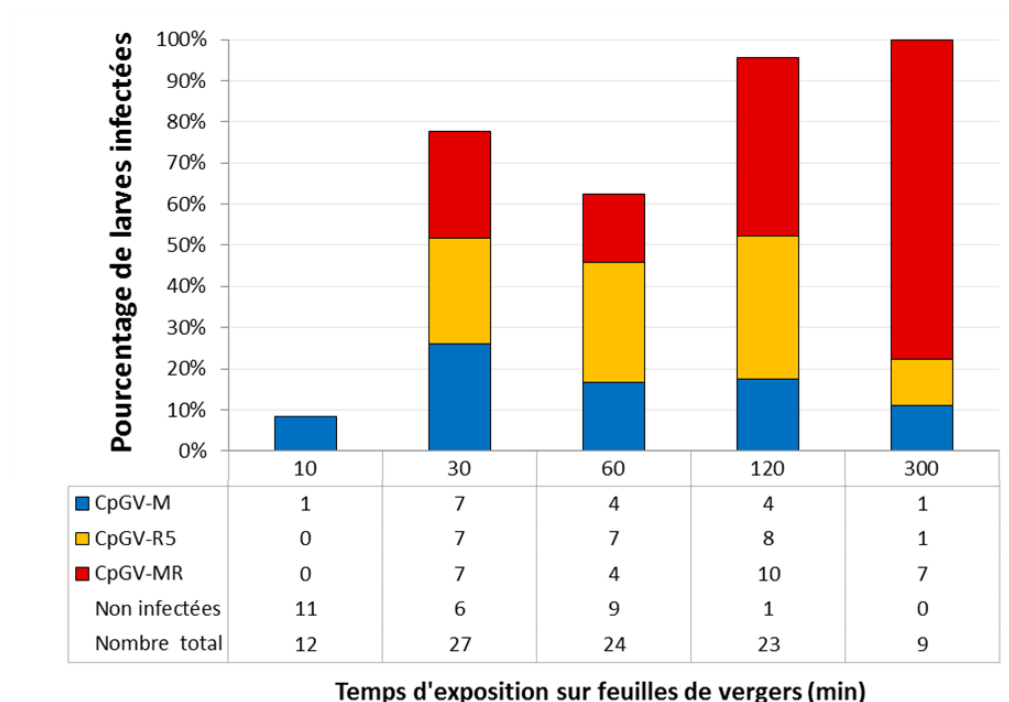


Figure 55 : Génotypes CpGV retrouvés 72 hp.i. dans des larves CpNPP infectées sur des feuilles infestées en verger avec la Carpovirusine® Evo2. L'effectif est représenté dans le tableau sous le graphique.

D'autres infections ont ensuite été réalisées avec des insectes résistants au virus CpGV-M (R_{GV}), dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 56).

Le nombre d'infections CpGV-R5 est beaucoup plus faible que lors des infections contrôlées en laboratoire ($2,16 \times 10^5$ OB.cm⁻²) et n'excède pas 30 %. Pourtant aux temps 30 min et 5 heures d'exposition au virus certaines larves sont double infectées. Ces résultats ne sont probablement pas représentatifs de la réalité dans le verger. En effet, ils ne sont pas cohérents avec ceux obtenus lors des infections sur du milieu nutritif (Figure 50). Ils ont été obtenus en milieu de saison, sur des feuilles plus âgées, et donc, plus dures ; et ils n'ont pas pu être répétées.

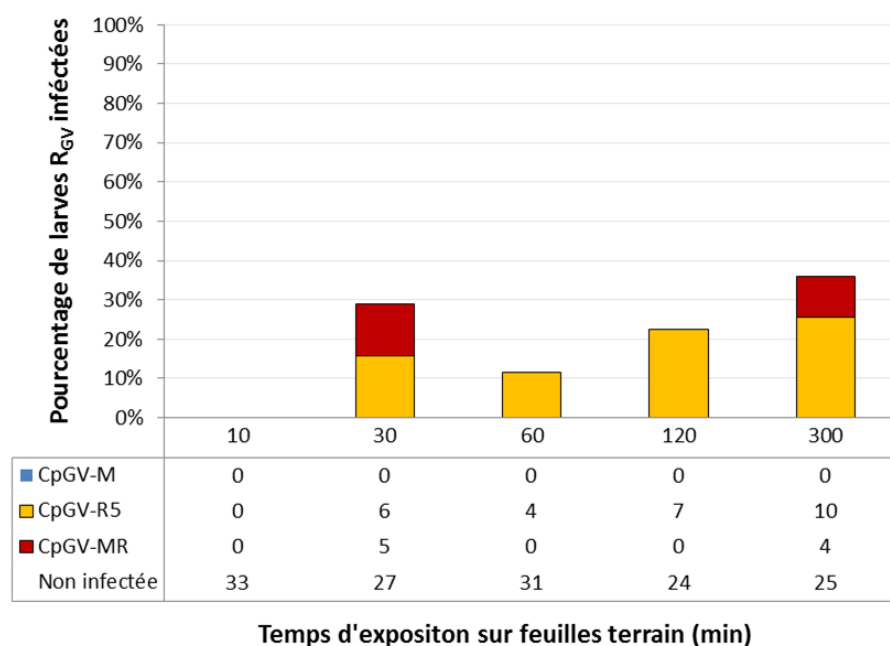


Figure 56 : Génotypes CpGV retrouvés 72 hp.i. dans des larves R_{GV} infectées sur des feuilles infestées en verger avec la Carpovirusine[®] Evo2. L'effectif est représenté dans le tableau sous le graphique.

V. DISCUSSION ET CONCLUSION

Un point clé du succès du contrôle de l'infestation des pommes par le carpocapse est la dynamique d'ingestion du produit dispersé à la surface du pommier par les larves. Dans ce chapitre nous avons étudié ce point, en prenant en compte le fait que les populations d'insectes présents dans les verges peuvent être sensibles ou résistantes au CpGV-M, et que les produits dispersés peuvent contenir seulement du CpGV-M ou un mélange de génotypes.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur la dispersion et l'occurrence de CpGV en verger (concentration et homogénéité) afin de reproduire ces conditions en laboratoire. En effet, il est difficile de travailler directement à partir des larves issues du terrain (faible effectif). De plus, effectuer une PCR en éluant directement les feuilles de terrain pour estimer la concentration virale est impossible, en raison des adjuvants présent dans les biopesticides qui sont des inhibiteurs PCR. Les conditions de laboratoire (concentration virale) ont été ajustées de façon à correspondre au mieux à la réalité du terrain.

Des expériences de dispersion virale ont été réalisées dans notre laboratoire (Figure 48). Nous avons étudié la dispersion théorique du virus et déduit la probabilité d'ingestion des deux génotypes lors de dispersions de mélanges. La distribution a été calculée à partir d'une loi binomiale (Figure 47), en partant du postulat que la distribution virale est aléatoire et homogène et que la larve se déplace et mange

aléatoirement. En réalité, dans des conditions naturelles, les larves peuvent avoir de l'appétence par exemple pour certaines levures épiphytes [318]. De plus, les produits commerciaux à base de baculovirus contiennent des agents protecteurs contre les UV (sans ces agents la moitié du pouvoir pathogène est détruit en 2 jours [44], oxyde d'aluminium ou dioxyde de titane), et des attractants pour les larves [314]. Nous n'avons pas d'étude sur le comportement des larves ce qui ne nous permet pas d'affirmer qu'il existe une forme d'attraction ou de répulsion du virus sur les larves. Les résultats présentés ici (infection en laboratoire vs infection en verger) ont été obtenus à partir de larves provenant de nos élevages, et non de larves issues du terrain et ne font que simuler la situation en verger.

Le statut d'infection des larves a été déterminé par qPCR et analyse HRM chez les deux types de populations de *C. pomonella* (sensibles et résistantes). Lors de tests individuels sur des larves sensibles, les deux génotypes sont détectés et la fréquence des infections mixtes augmente avec le temps. En conditions de laboratoire, nous sommes capables d'obtenir des taux d'infection mixtes atteignant les 100% en modifiant deux paramètres : soit en augmentant le temps d'exposition des larves au virus, soit en augmentant la concentration virale en surface des feuilles (Figure 49).

La deuxième partie de ce chapitre a été consacrée à l'étude des paramètres de dispersion et de concentration virale sur des feuilles prélevées en verger directement après pulvérisation du produit. Deux vergers présentant des échecs de contrôle des populations de *Cydia pomonella* ont servi de terrains d'étude (section IV.1). Ces échecs peuvent être liés : à une résistance de type I ou III, à une plus forte concentration de ravageurs, comme dans certaines zones protégées du vent par des allées de cyprès (même si ces dernières permettent d'abriter des auxiliaires) (Figure 51), ou encore à une résistance comportementale qui réduit le temps d'exposition des larves au virus (Chapitre 1). Il semble que dans les vergers étudiés traités avec la Carpovirusine® Evo2, la concentration du virus soit suffisamment homogène (Figure 54) et élevée pour permettre aux larves d'être infectées en 1^{ère} génération. En effet, dans la première génération, le temps avant l'entrée dans le fruit est suffisamment longue pour garantir une probabilité d'ingestion de virus élevée. En revanche, elle semble insuffisante pour assurer un nombre correct d'infections doubles dans les vergers et garantir ainsi une gestion efficace des populations de carpocapse ; surtout si celles-ci présentent un taux de résistance important (Figure 55). Dans les générations suivantes, il a été montré que les femelles pondent plus à la surface du fruit [313], ce qui conduit à une réduction du temps d'exposition au virus et donc à une réduction de la probabilité d'ingestion.

Dans ce projet, nous n'avons pas analysé la persistance du virus sur les feuilles dans le temps. Un défaut de persistance serait lié à un défaut des adjuvants présents dans les produits de biocontrôle.

La méthode d'analyse par HRM pourrait être utilisée de manière plus systématique dans les vergers présentant des échecs de contrôle et, *in fine*, sur l'ensemble des vergers, pour anticiper le succès ou l'échec du traitement à un stade précoce, offrant au producteur la possibilité d'utiliser des approches

alternatives ; d'autant que le prix des consommables pour une réaction est d'environ 30 centimes d'euros par réaction. Comme la réplication du CpGV-M seul est impossible chez les larves porteuses de la résistance de type I, la proportion de larves négatives avec un test PCR sera une bonne estimation de la prévalence de la résistance de type I dans un verger traité avec un produit contenant uniquement du CpGV-M. L'utilisation de ce test sur la première génération permettra de changer le produit à la deuxième génération, si nécessaire. À l'inverse, si des infections par le CpGV-M pur sont détectées après un traitement avec des produits contenant les deux génotypes, la prévalence de la résistance de type I ne peut être complète. Hypothétiquement, si aucune larve n'est infectée par le CpGV-R5 lors d'un traitement avec un mélange de génotypes OB, cela révélerait un nouveau type de résistance bloquant spécifiquement les génotypes de type E. Cette résistance n'a pas encore été signalée.

CHAPITRE 6 : CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS L'INFECTION MULTIPLE

I. INTRODUCTION

Chez des insectes résistants de type I, le virus CpGV-M est incapable de se répliquer dans les cellules intestinales, mais franchit tout de même la membrane péritrophique [201]. Il a été montré qu'en présence du virus CpGV-R5, le virus CpGV-M se réplique [275]. Comment le virus CpGV-R5 aide le CpGV-M à se répliquer ? Existe-t-il des étapes clés dans l'infection de la larve pour que cette coopération s'effectue ?

La première étape dans la colonisation de l'insecte est celle de l'ingestion des OB et de l'infection de l'intestin. Nous avons commencé l'étude de cette étape. Pour qu'une infection multiple puisse s'établir, il faut que l'insecte ingère les deux génotypes, à moins qu'il y ait co-occlusion des deux génotypes (exception observée, voir Chapitre 1). Deux paramètres de l'étape d'ingestion du virus ont été vérifiés, l'ordre d'ingestion des virus et l'existence d'un délai entre l'ingestion de l'un puis de l'autre, durant lequel la larve reste susceptible au 2^{ème} virus. En culture cellulaire, il a déjà été démontré pour le SfMNPV que la probabilité de réussite de l'infection par un second virus est liée au délai entre la première infection et la seconde, on parle alors de fenêtre temporelle de surinfection [130].

La fenêtre temporelle est la conséquence de la réorganisation des filaments d'actine de la cellule. Une fois la pénétration du virus dans la cellule et la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme, cette nucléocapside migre vers le noyau en utilisant les filaments d'actine [319,320]. Ces filaments sont plus tard utilisés pour la migration des nucléocapsides nouvellement formées dans le noyau vers le cytoplasme pour générer les BV. Entre ces deux étapes, l'orientation des filaments change, et donc, empêche la migration de nouvelles nucléocapsides depuis la membrane vers le noyau. La surinfection des cellules n'est donc possible que durant une fenêtre temporelle contrainte par la réorganisation des filaments d'actine. Dans le modèle Cp/CpGV et avec les outils actuellement disponibles, il est seulement possible de déterminer la durée du délai d'ingestion permettant une double infection et non l'existence d'une fenêtre temporelle de surinfection, qui n'est accessible qu'au niveau de la cellule et non à celui de l'organisme.

Une fois l'ordre et le délai d'ingestion caractérisés, il s'agissait de déterminer i) si l'aide nécessaire pour permettre la réplication de CpGV-M est générique, par exemple en affaiblissant son hôte, le rendant permissif à une seconde infection quel que soit le premier pathogène ou ii) si l'aide apportée au virus CpGV-M est spécifique du virus CpGV-R5.. Pour comprendre si cette aide est spécifique ou générique (ex : affaiblissement de l'hôte permettant l'entrée de n'importe quel autre virus), nous avons testé la capacité d'un autre baculovirus, *Cryptophlebia peltastica* nucléopolyédrovirus (CrpeNPV), d'agir comme helper pour CpGV-M.

II. MÉCANISMES DES INFECTIONS MULTIPLES : ÉTAPE D'INGESTION DU VIRUS

II.1. Importance de l'ordre d'ingestion

Cette analyse a été effectuée sur des larves R_{GV} pour prendre en compte le blocage de CpGV-M. Les génotypes CpGV-M et CpGV-R5 ont été déposés sur différentes boîtes de milieu Stonefly *Heliothis* (20 cm²) à une concentration de 10^4 OB.cm⁻². Les larves R_{GV} néonates ont été déposées en surface du 1^{er} puis 2^{ème} milieu (CpGV-M ou CpGV-R5), pendant des temps variables. Puis les larves ont été transférées sur du milieu non infesté pour 3 jours (Figure 57). Les larves ont ensuite été broyées puis diluées et analysées par qPCR/HRM (détails de la méthode dans le Chapitre 4).

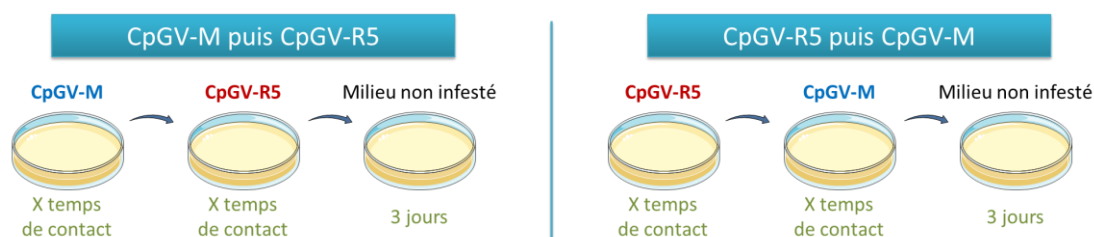
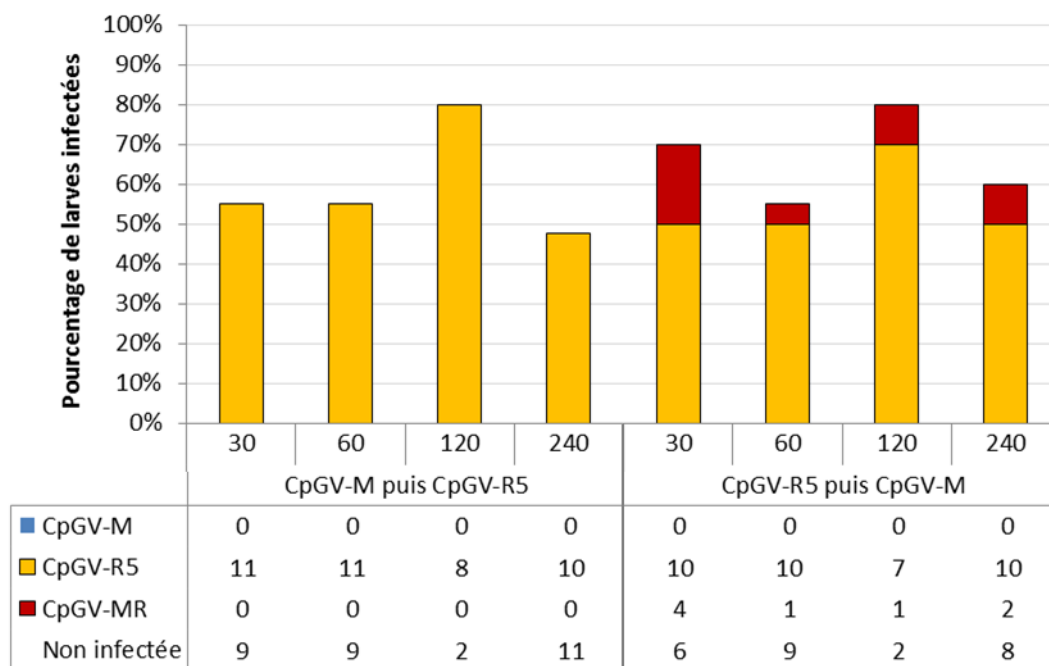


Figure 57 : Protocole de l'expérience ordre d'infection

Le pourcentage d'infection avec CpGV-R5 seul varie de 50% à 80% des individus. À cette concentration, on observe des infections doubles seulement si le virus CpGV-R5 est ingéré en premier (Figure 58).



Temps d'exposition au virus (min) en fonction de différents ordre d'infection

Figure 58 : Statut d'infection de larves R_{GV} inoculées avec les deux virus, dans les deux ordres.

II.2. Délai entre l'ingestion des différents génotypes

Dans la suite des expériences, notre intérêt s'est porté sur l'existence d'une limite au délai entre l'instant où la larve a ingéré le virus CpGV-R5 et celui où elle ingère le virus CpGV-M. Pour ce faire, nous avons cette fois fait varier le temps de latence entre l'exposition aux deux virus. Les larves néonates R_{GV} ont été déposées en premier sur le milieu infesté CpGV-R5 (30 minutes), puis elles ont été transférées sur du milieu non infesté et laissées pendant différents temps (X), puis transférées sur le milieu infesté avec CpGV-M (30 minutes de contact), puis retransférées sur du milieu non infesté pour 3 jours (Figure 59). Le statut d'infection des larves a été établi par qPCR/HRM.

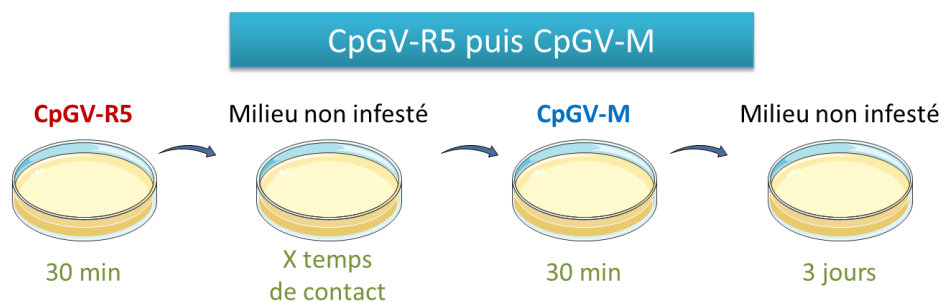


Figure 59 : Protocole de l'expérience du délai d'ingestion.

À une concentration virale de 10^4 OB.cm⁻², après 30 minutes de contact le pourcentage de larves infectées par le CpGV-R5 varie entre 66 et 80%. Le pourcentage de larves infectées par les deux virus varie entre 6 et 13% indépendamment du temps de latence entre l'exposition aux deux virus (Figure 60). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de limite dans le délai d'ingestion du virus CpGV-M pour qu'une double infection puisse s'établir. Une fois que le virus CpGV-R5 est ingéré, le virus CpGV-M peut se répliquer chez des individus avec une résistance de type I.

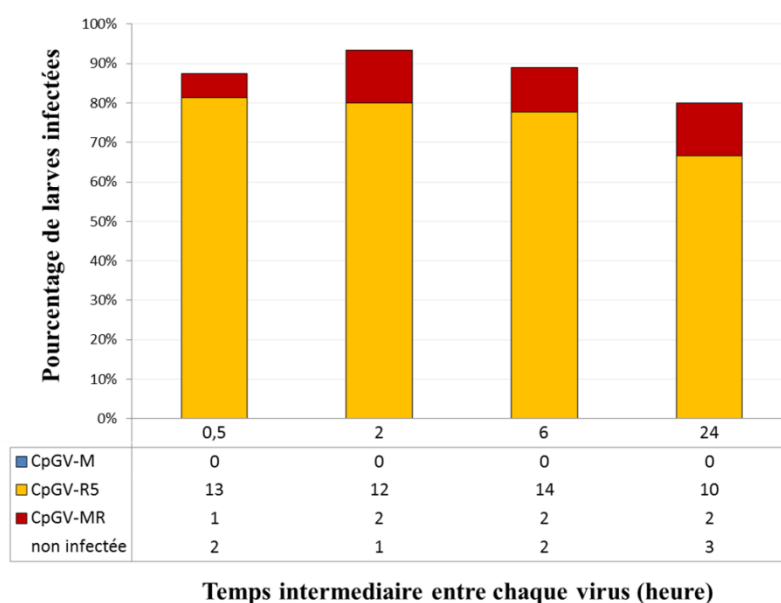


Figure 60 : Pourcentage de larves R_{GV} infectées en fonction de différents temps de latence entre l'exposition aux différents génotypes (heure). Les effectifs sont représentés dans le tableau.

III. EFFET « HELPER » POUR CPGV-M EN COINFECTION, GÉNÉRIQUE OU SPÉCIFIQUE ?

L'étude des infections entre plusieurs baculovirus présente plusieurs intérêts dans la lutte contre *C. pomonella*. D'une part ces infections ont un intérêt dans l'étude des mécanismes d'infection multiple et d'autre part un intérêt industriel pour leur utilisation en agronomie puisqu'il y a un faible nombre d'espèces virales répertoriées capables d'infecter ce ravageur : CpGV, *Choristoneura murinana* nucléopolyédrovirus (ChmuNPV), [321], et *Cryptophlebia peltastica* nucléopolyédrovirus (CrpeNPV). Le virus CrpeNPV est un SNPV isolé en 2018 en Afrique du Sud sur *Cryptophlebia peltastica* (ravageur du litchi). Il possède un génome de 115 728 bp (Numéros d'accès GenBank : MH394321) [273]. Ce virus a montré une efficacité biologique sur plusieurs lépidoptères Tortricidae, en plus de son hôte d'origine, *C. pomonella* (ravageur des pommes et poires) et *Thaumatotibia leucotreta* (le faux carpocapse, ravageur du citron). Le virus CrpeNPV a déjà été utilisé en coinfection avec un autre granulovirus, *Cryptophlebia*

leucotrete granulovirus (CrleGV, NC_005068). Le virus CrleGV a été découvert en Côte d'Ivoire en 1965 [322] et est utilisé depuis 20 ans en Afrique du Sud pour lutter contre *T. leucotrete* [323]. Il a été montré sur *T. leucotrete* que des mélanges de CrpeNPV et CrleGV ont une virulence accrue de trois à quatre fois (CL_{90}) par rapport aux virus purs [324]. Cette application a donné lieu à un brevet [325].

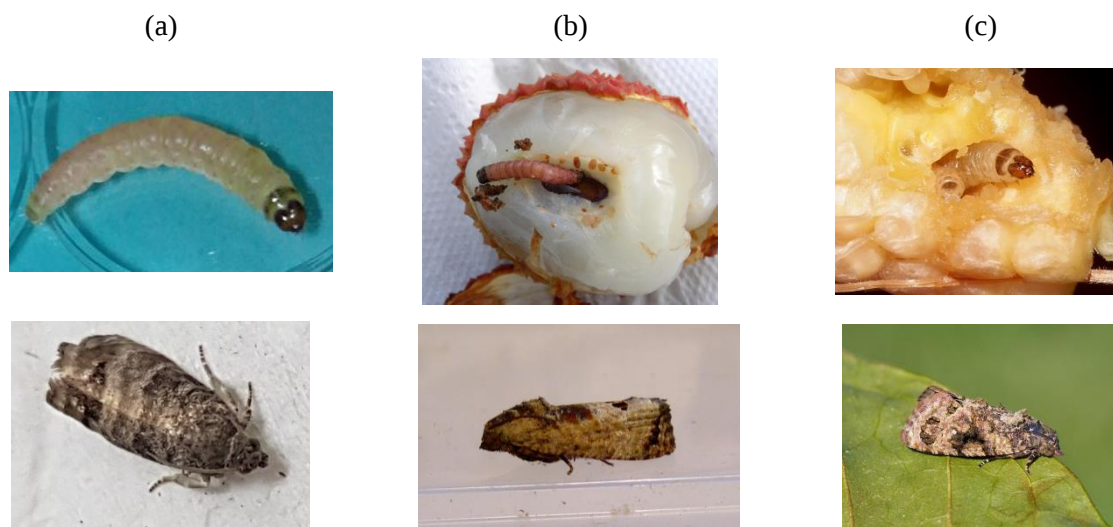


Figure 61 : Ravageurs (a) *Cydia pomonella*, (b) *Cryptophlebia peltastica* [326] et (c) *Thaumatotibia leucotrete* [327].

Nous avons étudié les interactions lors d'une coinfection entre CpGV-M et *Cryptophlebia peltastica* nucléopolyédrovirus (CrpeNPV-SA) (mis à notre disposition par les Pr. Sean Moore et Caroline Knox). Pour déterminer si une coopération entre les deux virus a lieu, nous avons regardé si le virus CrpeNPV permet à l'isolat CpGV-M de se répliquer chez des individus résistants de type I.

Nous avons réalisé trois contrôles. Le premier contrôle a consisté à vérifier si les deux virus peuvent coinfecter une même larve *C. pomonella*. Pour ce faire des larves L3 CpNPP, sensibles aux deux virus, ont été inoculées avec 800 OB. μL^{-1} de mélange viral (50% de CrpeNPV et 50% de CpGV). À 4 j.pi., les larves ont été récoltées, broyées dans 200 μL puis diluées au 1/50. Chaque échantillon a été analysé par deux qPCR l'une ciblant le gène *polh* pour identifier CrpeNPV (342 pb) et l'autre le gène *pe38* pour CpGV-M (121 bp). Chaque amplicon a été identifié par analyse HRM.

Des infections simples et doubles ont été obtenues. La T_{f_m} des amplicons de CpGV-M est de 81,8°C et de 84,4°C pour ceux de CrpeNPV, leur taille a été vérifiée par électrophorèse. Dans la Figure 62 est présenté le résultat de cette expérience. Les deux pics sont bien distincts, par ailleurs, comme chaque larve a été analysée séparément, il a été possible de déterminer que 80% des larves ont été coinfectées.

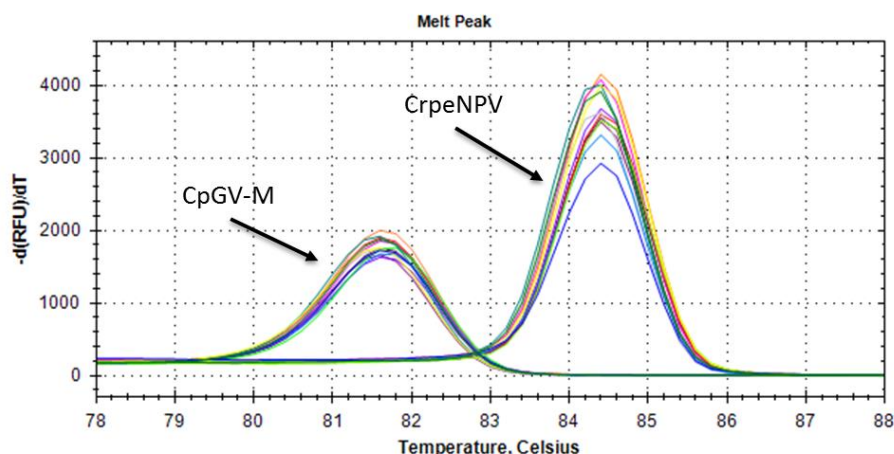


Figure 62 : Courbes de fusion des amplicons viraux résultant de la double inoculation de CrpeNPV et CpGV sur CpNPP. Chaque couleur représente une seule et unique larve.

Le deuxième contrôle a consisté à vérifier si le virus CrpeNPV seul se réplique sur R_{GV} . Les mêmes amplicons avec un T_{fm} de 84,4°C ont été obtenus. Le troisième contrôle a eu pour objectif de vérifier si les virus CpGV-R5 (capables de se répliquer sur des larves résistantes de type I) et CrpeNPV étaient capables de coinfecter des larves porteuses de la résistance de type I. Des larves R_{GV} ont été inoculées avec les isolats CpGV-R5 et CrpeNPV-SA. Comme pour CpNPP, il a bien été constaté que les larves R_{GV} sont permissives aux coinfections avec CpGV-R5 et CrpeNPV.

Finalement, des larves R_{GV} ont été inoculées avec les isolats CpGV-M et CrpeNPV-SA (en proportion 50/50). Aucune larve R_{GV} n'a été infectée par CpGV-M en présence de CrpeNPV. La réplication de CrpeNPV pouvant masquer celle de CpGV-M, les proportions de ce dernier ont été augmentées, (800 OB. μL^{-1} de CrpeNPV et 1600 OB. μL^{-1} de CpGV-M), mais nous n'avons pas réussi à observer de réplication de CpGV-M. Compte tenu de la sensibilité de la méthode, si une réplication de CpGV-M avait eu lieu, nous l'aurions vraisemblablement détectée.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que le mécanisme impliqué dans l'action « helper » de CpGV-R5 pour CpGV-M dans les larves résistantes de type I, n'est pas substituable par le virus CrpeNPV. Il s'agirait donc d'un processus spécifique et pas d'un affaiblissement général des barrières de la larve (par exemple, diminution de la réponse antivirale).

Les travaux précédents du laboratoire ont montré que lors d'une coinfection, l'isolat CpGV-R5 aide à la réplication de l'isolat CpGV-M. Dans ce chapitre, l'initiation de l'infection a été étudiée et plus particulièrement la phase d'ingestion du virus. Nous avons déterminé que pour qu'une infection double

(CpGV-MR) puisse s'établir chez une larve résistante de type I, il est essentiel que le virus CpGV-R5 soit ingéré en premier. Il était donc intéressant d'explorer s'il existait un délai maximal d'ingestion entre ces deux virus. Il a été constaté que le nombre d'infections doubles par CpGV-M et CpGV-R5 reste constant, même si le deuxième virus est inoculé longtemps (24 heures) après le premier. Ceci suggère qu'une infection double ne semble pas dépendre d'un délai d'ingestion. Pour approfondir davantage sur les mécanismes mis en œuvre au niveau des cellules intestinales il aurait fallu utiliser la technologie ANCHOR ([Chapitre 3](#)), mais les virus marqués n'ont pas encore pu être purifiés.

Le troisième aspect des mécanismes des infections multiples étudié concerne l'effet « helper » de CpGV-R5 et la restriction de l'espèce virale coinfectante. Pour l'étudier, deux espèces virales capables d'infecter Cp, CrpeNPV et CpGV-R5 ont été inoculées à des larves R_{GV} (porteuses de la résistance de type I et donc non permissives à l'isolat CpGV-M). Il a été observé que le virus CpGV-M ne se répliquait pas dans les larves même en présence de CrpeNPV. Le blocage principal qui empêche l'infection des larves R_{GV} par CpGV-M ne se trouve pas au niveau du passage de la membrane péritrophique mais lors du démarrage de la réplication virale [201]. Il est possible d'affirmer ici que le besoin d'aide requis par CpGV-M ne peut être satisfait par n'importe quel virus infectant *C. pomonella*.

Statistiquement, la probabilité pour que les deux virus aient coinfecté au hasard la même cellule intestinale est quasi nulle au vue du faible nombre de particules virales ingéré par une larve et du très grand nombre de cellules intestinales. Deux mécanismes sont possibles. Soit les deux virus n'infectent pas les mêmes cellules, mais l'infection d'une cellule par le virus capable de se répliquer permet à d'autres cellules d'accepter la réplication de CpGV-M, soit les virus infectent nécessairement la même cellule (*cis*), alors l'effet « helper » s'effectue en partie lors de l'entrée du virus.

Dans le premier cas, ceci impliquerait que le virus « helper » aide le virus CpGV-M à distance (*trans*). En utilisant le CrpeNPV on a pu tester si cette aide serait « non spécifique », par exemple, en affaiblissant les barrières de défense. Les travaux sur les facteurs de synergie (*synergistic factors*) découverts par Tanada [234], et explorés par l'équipe de Granados [328] sont un exemple de ce type de facilitation. Une destruction partielle de la membrane péritrophique grâce au virus *Pseudaletia unipuncta* GV permet à un virus incapable de coloniser un hôte (le NPV de *Pseudaletia unipuncta*) de rentrer et se répliquer [329].

Dans le modèle Cp RGV, la restriction permettant la réplication du CpGV-M n'est pas levée par le CrpeNPV, mais l'est par le CpGV-R5. Il ne s'agit donc pas d'un point de blocage « généraliste », mais bien spécifique. Les virus CpGV et CrpeNPV sont originaires de deux régions du globe complètement différentes, ils n'ont jamais co-évolué ensemble et aucune entraide n'a été observée. Il aurait été intéressant de savoir si après plusieurs passages successifs (sur larves sensibles), les deux virus coopèrent. Si tel est le cas, le virus CpGV-M se serait-il répliqué sur des larves R_{GV} en présence de CrpeNPV et est-ce que l'efficacité des mélanges aurait augmenté (à évaluer par test biologique) ?

L'infection préalable d'une larve RGV par CpGV-R5 permet la réplication de CpGV-M, et ceci indépendamment du délai entre l'ingestion des deux virus. Les études faites sur l'infection de l'intestin avec les NPV indiquent que cette infection est transitoire, et que les cellules intestinales se renouvellent rapidement. Si chez les GV les caractéristiques d'infection sont similaires, la probabilité de trouver des cellules intestinales infectées par CpGV-R5 qui permettraient une sur-infection par CpGV-M devrait diminuer avec le temps. Ce n'est pas ce que nous observons. Soit les cellules intestinales ne se renouvellent pas aussi vite que chez les NPV, soit il n'est pas nécessaire que les cellules soient préalablement infectées par CpGV-R5 pour permettre la réplication de CpGV-M, ce qui impliquerait l'existence d'un signal qui permet la réplication de CpGV-M. La production de signaux extracellulaires lors d'une infection virale a été décrite chez les bactériophages, ou ce signal permet l'ajustement des changements de phase entre le cycle litique et la lysogénie. Sous la seconde hypothèse, l'entrée dans les cellules ne se ferait pas au hasard, mais l'infection d'une cellule par CpGV-R5 « attirerait » CpGV-M vers cette même cellule. [330].

Si la purification du virus CpGV-ANCHOR avait été achevée ([Chapitre 3](#)), nous aurions pu observer les coinfections entre CpGV-M et CpGV-R5 marquées par la technologie ANCHOR™ et CrpeNPV par microscopie. Ainsi il aurait été possible de déterminer s'il y a coïnfection des cellules intestinales, ou s'il y a co-occlusion entre les deux virus dans des corps d'occlusion de type « polyèdre ». Les résultats de ce travail auraient des retombées applicatives via l'analyse des caractéristiques des OB formés (propriétés parentales ou nouvelles) lors des infections multiples (pathogénicité, virulence, spectre d'hôtes). Est-ce que les génomes resteraient individualisés ou serait-il possible d'observer l'apparition de génomes recombinants entre les deux virus parentaux ? Ces travaux auraient aussi des retombées « académiques », car ce type d'infection permet de déterminer si les deux virus sont mutuellement exclusifs (si l'infection d'une cellule par l'un des virus exclut l'infection de l'autre), ou au contraire, s'il y a réplication des deux virus dans la même cellule, et de déterminer si les OB formés sont de deux types indépendants, ou s'il y a des polyèdres encapsulant à la fois des génomes du GV et des génomes du NPV, et dans quelles proportions.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Cette thèse intitulée « Structuration des populations de baculovirus. Importance des infections multiples » a eu pour objectif d'explorer la durabilité des moyens de protection des cultures en utilisant la diversité génétique naturellement présente dans les populations baculovirales face à l'apparition de nouvelles résistances.

Les travaux entrepris ont été financés par la région Occitanie, dans le cadre d'un partenariat entre l'entreprise NeoVirTech et l'IMT Mines Alès, avec l'appui de l'INRA et du GRAB. Le modèle d'étude de cette thèse a été le carpocapse *Cydia pomonella*, ravageur des pommes et des poires, et son baculovirus CpGV, en raison de son impact économique pour la production fruitière fortement implantée dans le sud de la France et particulièrement concernée par l'apparition de résistances.

L'utilisation de produits de biocontrôle visant le carpocapse et contenant un seul génotype de baculovirus s'est heurtée à la capacité des insectes à développer des résistances, ce qui à terme compromet l'utilité industrielle de ces produits. On sait par contre que les populations virales ayant une diversité génétique persistent dans les populations d'insectes (carpocapses et autres espèces), même dans celles qui développent des résistances spécifiques à un ou plusieurs génotypes particuliers. De plus, il a été constaté chez certaines espèces que lorsque plusieurs de ces génotypes viraux parviennent à infecter un même hôte, l'efficacité de l'ensemble est supérieure à leurs efficacités individuelles ([Chapitre 1](#)). La persistance de cette diversité génétique au niveau de la population virale adresse des questions à plusieurs niveaux : i) au niveau de la population hôte : s'agit-il d'une coinfection généralisée ? Ou du cumul d'infections simples dans chaque larve ? ii) au niveau de chaque larve considérée individuellement, existe-il des mécanismes favorisant ou bloquant les infections par des génotypes différents ? iii) au niveau de chaque cellule, est ce qu'il y a infection multiple généralisée et quelles sont les conséquences au niveau des particules virales issues de cette éventuelle coinfection ?

Pour répondre à ces questions, la limite majeure résidait dans le manque d'outils à disposition pour permettre le suivi de différents génotypes viraux, dans notre cas, ceux du CpGV. Cette thèse a été consacrée au développement d'outils permettant la détection et la quantification des différents génotypes de CpGV et à leurs applications pour l'étude de la dynamique des infections multiples.

Le premier outil prend avantage de la technologie ANCHOR™ ([Chapitre 3](#)). Pour vérifier l'adaptabilité aux contraintes particulières des modèles viraux et des insectes, cette technologie a été adaptée au baculovirus AcMNPV, pour lequel des cultures cellulaires et des outils moléculaires de génie génétique étaient disponibles. Ce modèle a permis de visualiser les différents génotypes *in vivo* afin de localiser chacun à l'échelle cellulaire. La synthèse et la purification des virus CpGV recombinants (CpGV-ANCHOR) a été plus laborieuse et plus longue que prévu, ce qui ne nous a pas permis d'observer les infections multiples du CpGV à l'échelle cellulaire. Une partie des questions dépendant de l'obtention de ces virus marqués est donc restée en attente. Nous n'avons pas pu visualiser le processus d'entrée des différents génotypes au niveau des cellules intestinales chez le carpocapse.

Le second outil développé est basé sur la quantification des proportions de chaque génotype *via* les différences dans le point de fusion de fragments d'ADN. À partir de l'amplification qPCR du gène *pe38* du CpGV (différente en fonction des génotypes) l'analyse par HRM a été réalisée ([Chapitre 4](#)). La limite principale de cet outil est qu'il est basé exclusivement sur le gène *pe38*. Comme celui-ci n'est pas le seul gène impliqué dans la résistance de type I, il serait intéressant de trouver les autres gènes viraux impliqués dans la résistance du carpocapse. Une collaboration à ces fins a été entreprise avec l'IRBI (Tours) afin de conduire une analyse fine de données de séquençage de 5 isolats de CpGV.

En mettant à profit ces deux outils, nous espérons tester plusieurs hypothèses sur le déroulement des infections multiples. En partant du postulat communément admis d'une ingestion aléatoire des corps d'inclusion du CpGV, la probabilité de l'infection double d'une cellule intestinale est minime puisque l'infection des larves se fait par l'ingestion d'un nombre limité, voire un seul OB, et le nombre de cellules intestinales est de plusieurs dizaines de millions. Deux hypothèses pourraient expliquer les observations d'infections à plusieurs génotypes dans les mêmes larves :

- Si les deux génotypes n'agissent pas comme entités indépendantes, mais comme partiellement associées, la probabilité d'une infection double de la même cellule ne suit pas une loi binomiale et devient donc plus fréquente. Dans ce cas, comment ces deux génotypes s'associent ?
- Une hypothèse alternative est qu'une fois que l'un des génotypes a infecté la larve avec succès, il rend les cellules de celle-ci permissives à d'autres génotypes. Cela implique l'existence d'un signal qui se diffuse d'une cellule à l'autre tel que décrit récemment chez les bactériophages [\[330\]](#).

L'étude des infections multiples en utilisant l'approche HRM au niveau de la larve et la population d'insecte donne quelques informations à ce sujet ([Chapitre 6](#)). Dans une larve résistante de type I, il est essentiel pour qu'une infection double (CpGV-MR) puisse s'établir que le virus CpGV-R5 soit ingéré en premier, mais il n'existe pas de délai maximum entre l'ingestion des deux virus. De plus, l'effet « helper » est spécifique : le virus « helper » ne peut être substitué. Mais comment le virus CpGV-R5 rend

il l'hôte permissif à la réplication de CpGV-M ? La réponse à cette question éclairera sur les mécanismes moléculaires de l'infection, mais aussi sur l'importance de la structuration génétique des populations virales. Il s'agit donc d'une des questions clé à explorer, et qui sera accessible une fois les virus CpGV ANCHOR développés.

Pour étudier la structuration des populations de baculovirus en verger, il a été nécessaire de connaître le statut d'infection d'un nombre représentatif d'individus d'une population, ce que l'approche d'analyse HRM rend relativement aisé. Par contre, il n'est pas possible de collecter un nombre suffisant de larves dans le verger : les larves infectées meurent rapidement et restent de taille très petite. C'est pour cela qu'une approche mixte, à partir des feuilles traitées dans les vergers, mais avec des larves provenant de nos élevages de laboratoire a été privilégiée.

En collaboration avec les pomiculteurs, l'INRA et le GRAB, cet outil a été utilisé afin d'estimer les dynamiques d'infection en verger ([Chapitre 5](#)). Les premières études conduites sur la colonie CpNPP (sensible au virus CpGV-M) montrent que la dose et les proportions de chaque génotype sont satisfaisantes pour assurer des infections au sein des populations de Cp, si le temps de contact avec le virus est suffisamment long (c'est le cas pour les premières générations d'insecte). Pour les insectes résistants, les données ne sont pas aussi fiables. Les expériences réalisées sur feuilles ne montrent pas des niveaux de mortalité suffisants. Ceci est surprenant car la concentration virale sur les feuilles est équivalente à celle utilisée lors des tests en laboratoire et pour lesquelles les larves R_{GV} meurent. Il peut s'agir d'un problème lié aux conditions climatiques lors des expériences (trop fortes températures) et feuilles pas assez tendres. Ceci est un point à vérifier lors de la prochaine saison.

Les outils de détection développés dans cette thèse ont montré leur pertinence pour répondre aux questions posées. L'impossibilité d'obtention, dans le temps de cette thèse, des virus CpGV-ANCHOR purifiés n'a pas permis d'étudier les infections multiples au niveau de la cellule, laissant de multiples questions sur les mécanismes d'infection. La combinaison des études basées sur la technique HRM en laboratoire et à partir de feuilles de verger, a permis d'apporter des connaissances nouvelles sur la dynamique d'infections multiples, mais des expériences complémentaires sont nécessaires.

Ces travaux permettent dès à présent de dégager quelques pistes d'amélioration pour les produits commerciaux à base de CpGV et leurs modes d'application. Si les doses préconisées semblent suffisantes pour une protection en première génération, il apparaît que pour les générations suivantes il serait nécessaire de les augmenter pour compenser la diminution du temps de contact avec les larves. Dans les conditions actuelles, le niveau de protection ne semble pas suffisant. Les infections multiples, qui peuvent augmenter l'efficacité du contrôle et diminuer la dispersion de résistances sont assez fréquentes seulement dans la première génération.

Les populations naturelles de CpGV se sont adaptées en continu au fond génétique de leurs populations hôtes, en sélectionnant le génotype (ou plus probablement les génotypes) capables de les infecter. Cette adaptation qui se fait dans la nature au fur et à mesure de la multiplication du virus, n'est pas possible avec les modes de production des bioinsecticides actuels. Si cette adaptation du virus en continu est empêchée, l'insecte pourra développer des résistances de façon similaire à ce qu'il fait avec les insecticides chimiques. La stratégie de formulation qui semble représenter le moins de risques est la production de mélanges de différents génotypes, accompagnée d'une surveillance en fin d'année pour détecter les variations dans la susceptibilité des populations hôte.

BIBLIOGRAPHIE

1. Suty, L. *La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques*; Quae, 2010.; Sick, I.: Dijon (France), 2010; ISBN 2759206122, 9782759206124.
2. Sharma, S.; Kooner, R.; Arora, R. Insect pests and crop losses. In *Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture*; Springer Singapore, 2017; pp. 45–66 ISBN 978-981-10-6055-7.
3. L'oppidum d'Ensérune - Hérault. Disponible en ligne : <http://photo.stereo.free.fr/tourisme-montpellier/oppidum-d-enserune-herault.php> (accessed on Jul 15, 2020).
4. Hórreos et paneras, les greniers des Asturies. Disponible en ligne : <https://www.papillesetpupilles.fr/2017/05/horreos-et-paneras-les-greniers-des-asturies.html/> (accessed on Jul 15, 2020).
5. Cucchi, T.; Vigne, J.-D. Origin and diffusion of the house mouse in the mediterranean. *Hum. Evol.* **2006**, 21(2), 95–106, doi : 10.1007/s11598-006-9011-z.
6. Huang, H.T.; Yang, P. The ancient cultured citrus ant. *BioScience*, **1987**, 37(9), 665–671, doi:10.2307/1310713.
7. Bissessur, P.; Florens, V. Predation of the Mauritius endemic Macchabée Skink, *Gongylomorphus bojerii fontenayi*, by the Common myna, *Acridotheres tristis*. *Bull. Phaethon* **2018**, 48, 91–93.
8. Pimentel, D. Biology of the Indian Mongooose in Puerto Rico. *J. Mammal.* **1955**, 36(1), 62–68, , doi : 10.2307/1375723.
9. Egyptian life and death. Disponible en ligne : <https://www.britishmuseum.org/collection/galleries/egyptian-life-and-death#&gid=1&pid=1> (accessed on Jul 15, 2020).
10. *Oecophylla smaragdina*. Disponible en ligne : <https://www.antkeepingdepot.com/products/green-tree-ant-oecophylla-smaragdina-colony> (accessed on Jul 15, 2020).
11. Indian Grey Mongooose *Herpestes edwardsii*. Disponible en ligne : <https://www.pinterest.fr/pin/756112224923257203/> (accessed on Jul 15, 2020).
12. Gatignol, C.; Étienne, J.-C. *Rapport sur les pesticides et la santé*. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. 2009, 262.
13. Millet, M.; Bedos, C. La contamination de l'atmosphère par les produits phytosanitaires. Protéger les végétaux des attaques de pesticides nuisibles. *Pollut. atmosphérique* **2016**, 229, 166–176.
14. Talmud, J. Une page médiévale de l'histoire de la pharmacie avec le Traité des Poisons de Moïse Maïmonide. 1204 - 2004 : contribution à la commémoration du 800e anniversaire de sa mort. *Rev. Hist. Pharm. (Paris)*. **2004**, 92(344), 607–613, doi:10.3406/pharm.2004.5718.

15. Dalby, A. *Geoponica - Farm Work*; Prospect Books: Totnes, 2011, 368.
16. Schiffers, B. L'emploi des pesticides dans les cultures : entre tracteurs et détracteurs. *Probio* **2012**, 2, 80–93.
17. Heidelberger, D. De l'utilisation des pesticides aux techniques de biocontrôle, Thèse de doctorat. Université de Rouen, 2017, 224.
18. Réaumur, M. *Memoires pour servir a l'histoire des insectes*. A Paris : De l'imprimerie royal : Paris, 1734.
19. The Nobel Prize Paul Müller – Biographical. Disponible en ligne : Biographical. NobelPrize.org (accessed on Apr 6, 2020).
20. Carson, R. *Silent Spring*. First Edition.; Houghton Mifflin Company : New York, 1962, 368.
21. Perkins, J.H. *Insects, experts, and the insecticide crisis: The quest for new pesticide management strategies.*; Plenum Press. Springer US: New York, 1982, 304, ISBN 978-1-4684-3998-4.
22. Thybaud, E. Toxicité aigue et bioconcentration du lindane et de la deltaméthrine par les têtards de *Rana temporaria* et les gambusies (*Gambusia affinis*). *Hydrobiologia*, **1990**, 190(2), 137–145, doi:10.1007/BF00014104.
23. Fry, D.M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Env. Heal. Perspect.* **1995**, 103(7), 165–171, doi:10.1289/ehp.95103s7165.
24. Sharp, D.S.; Eskenazi, B.; Harrison, R.; Callas Arz, P.; Smith, A.H. Delayed health hazards of pesticide exposure. *Ann. Rev. Public Heal.* **1986**, 7(1), 441–71, doi:10.1146/annurev.pu.07.050186.002301.
25. Wezel, A.; Bellon, S.; Doré, T.; Francis, C.; Vallod, D.; David, C.; Doré, T. Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agron. Sustain. Dev* **2009**, 29(4), 503–515, doi:10.1051/agro/2009004i.
26. Rohrmann, G. *Baculovirus Molecular Biology* 3rd Bethesda Ed. 2013.
27. Kroemer, J.A.; Kroemer, J.A.; Bonning, B.C.; Harrison, R.L. Expression, delivery and function of insecticidal proteins expressed by recombinant baculoviruses. *Viruses* **2015**, 7(1), 422–455, doi:10.3390/v7010422.
28. Bassi, A. *Del mal del segno calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachi da seta e sul modo di liberarne le bigattaje anche le più infestate*; 1835.
29. Pasteur, L. *Etudes sur la Maladie des Vers à Soie, moyen pratique assuré de la combattre et d'en prévenir le retour. Tome I: La Pébrine et la Flacherie*; Gauthier-Villars, Ed.; Paris, 1870.
30. Vida, M.G. *De Bombyce*; 1527; ISBN 9783631580820.
31. Hofmann O. *Die Schlafsucht (Flacherie) Der Nonne (Liparis Monacha) Nebst Einem Anhang. Insektentötende Pilze Mit Besonderer Berücksichtigung Der Nonne. Forstl. Naturwiss* **1891**, 1(31).
32. Paillot, A. *Sur la grasserie du Ver à soie*; Compte rendu hebdomadaire de la séance académique, Ed.; Paris, 1926.
33. Bergold, G.H.; Wellington, E.F. Isolation and chemical composition of the membranes of an

- insect virus and their relation to the virus and polyhedral bodies. *J. Bacteriol.* **1954**, 67(2), 210–216.
34. Benz, G.A. Introduction: Historical perspectives. In *Biology of Baculoviruses*. Granados, R.R., Federici, B.A., Eds. CRC Press : Boca Raton, FL, 1986. pp. 1–35.
 35. Bargoin V. « VIRUS » Disponible en ligne : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/virus/> (accessed on Jan 30, 2020).
 36. Huber, J. Use of baculoviruses in pest management programs. In *The Biology of Baculoviruses*; Granados, R.R., Federici, B., Eds.; CRC press: Boca Raton (Floride), 1986; pp. 181–202.
 37. Moscardi, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **1999**, 44(1), 257–289, doi:10.1146/annurev.ento.44.1.257.
 38. Baird, A.B. Biological control of insect pests in Canada with special reference to the European spruce sawfly *Gilpinia polytoma*. In *Proceedings of the Report of the Entomology Society*, 70; Ontario, 1940; pp. 51–56.
 39. Dahlsten, D.L.; Mills, N.J. Biological control of forest insects. In *Handbook of biological control*; Bellows T. S., Fisher T.W., Eds. Academic Press, 1999; pp. 761–788 ISBN 978-0-12-257305-7.
 40. Balch, R.E.; Bird, F.T. A disease of the European spruce sawfly, *Gilpinia hercyniae* (Htg.), and its place in natural control. *Sci. Agric.* **1944**, 25(2), 65–80, doi:10.4141/sa-1944-0049.
 41. Bird, F.T.; Elgee, D.E. A virus disease and introduced parasites as factors controlling the European spruce sawfly, *Diprion hercyniae* (Htg.) in central New Brunswick. *Canad. Ent.* **1957**, 89(8), 371–78, doi:10.4039/Ent89371-8.
 42. Bird, F.T.; Burk, J.M. Artificially disseminated virus as a factor controlling the European spruce sawfly, *Diprion hercyniae* (Htg.), in the absence of introduced parasites. *Canad. Ent.* **1961**, 93(3), 228–38, doi:10.4039/Ent93228-3.
 43. Francois, S. Diversité et écologie des virus associés aux arthropodes : des communautés aux génomes, Thèse de doctorat. Université de Montpellier, 2017, 263.
 44. Hurpin, B. Evolution de l'utilisation en lutte biologique de préparations à base de virus. *Bull. la Société Entomol. Fr.* **1984**, 89(1-4), 794–800.
 45. Hall, D.W. Pathobiology of invertebrate icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses (Iridoviridae). In *Viral insecticides for biological control*; Maramorosch, K., Ed. Academic Press: New York, 1985, pp. 163–196.
 46. Lavie, P.; Fresnaye, J.; Vago, C. L'action de la virose à noyaux denses sur les larves de *Galleria mellonella* dans les ruches. *Ann. l'Abeille* **1965**, 8(4), 321–323, doi:10.1051/apido:19650406.
 47. Genty, P.; Mariau, D. Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Limaconidae). *Oléagineux* **1975**, 30(8-9), 349–354.
 48. Monsarrat, P.; Mariau, D.; Genty, P. Densovirus en lutte biologique. *Densovirus en lutte Biol. Bull. la Société Entomol. Fr.* **1984**, 89(1), 816–821.
 49. Monsarrat P. *Comparaison du niveau des dégâts causés par Oryctes rhinoceros aux cocotiers*

- avant et après l'introduction de rhabdovirus orcytes a wallis*; 1972, 112.
50. The use of viruses for the control of insect pests and disease vectors. In Proceedings of the report of a Joint FAO/WHO Meeting on Insect Viruses; Geneve (Suisse), 1973; p. 48.
 51. Döller, G. The safety of insect viruses as biological control agents. In *Viral insecticides for biological control*. Maramorosh K., Ed. Academic Press: New York, 1985, pp. 399–439.
 52. Harrap, K.A. Assessment of the human and ecological hazards of microbial insecticides. *Parasitology* **1982**, 84(4), 269–296, doi:10.1017/S0031182000053671.
 53. Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). *Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No.20:Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving baculoviruses*; 2002.
 54. Kost, T.A.; Condreay, J.P.; Jarvis, D.L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23(5), 567–575, doi:10.1038/nbt1095.
 55. Chambers, A.C.; Aksular, M.; Graves, L.P.; Irons, S.L.; Possee, R.D.; King, L.A. Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2018**, 91(1), 5.4.1-5.4.6, doi:10.1002/cpps.47.
 56. *Molecular insect science. Proceedings of the International Symposium on Molecular Insect Science*; Hagedorn, H.H., Hildebrand, J.G., Kidwell, M.G., Law, J.H., Eds.; Springer US: Tucson (Arizona), 1990; ISBN 978-1-4899-3668-4.
 57. Burges, H.D. Possibilities of pest resistance to microbial control agents. In *Microbial Control of Insects and Mites*; Burges, H.D., Hussey, N.W., Eds. Academic press: London, 1971, pp. 445–457.
 58. Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, 132, 1–41, doi:10.1016/J.JIP.2015.07.009.
 59. *Viral Insecticides for Biological Control*; Maramorosch, K., Sherman, K.E., Eds.; Academic Press: Londres (Royaumme Uni), 1985; ISBN 0-12-470295-3.
 60. Cheng, T.; Xu, C.; Wang, Y.; Chen, M.; Wu, T.; Zhang, J.; Xia, N.-S. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J. Gastroenterol.* **2004**, 10(11), 1612–1618, doi:10.3748/wjg.v10.i11.1612.
 61. Bailey, M.J.; Fujita, F. Specific immunological response against the granulosis virus of the codling moth (*Cydia pomonella*) in woodmice (*Apodemus syhaticus*): field observations. *Ann. appl. Biol* **1987**, 111(3), 649–660, doi:10.1111/j.1744-7348.1987.tb02022.x.
 62. Ishimori, N. Contribution a l'étude de la grasserie du ver a soie (*Bombyx mori*). *Compt. rend. soc. biol.* **1934**, 116, 1169–1170.
 63. Xeros, N. A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature* **1954**, 174(4429), 562–563.
 64. Huger, A. Granuloses of insects. In *Insect pathology*; Academic Press, 1963; pp. 531–575.

65. Meynadier, G.; Vago, C.; Plantevin, G.; Atger, P. Virose d'un type habituel chez le Lepidoptere, *Galleria mellonella* L. *Rev. Zool. Agr. Appl.* **1964**, *63*, 207–209.
66. Kawase, S. Pathology associated with densovirus. In *Viral insecticides for biological control*; Maramorosh K., Sherman K. E., Eds.; Academic Press: New York, 1985; pp. 197–231.
67. Kurstak, E.; Garzon, S.; Onji, P.A. Réplication simultanée de deux virus à DNA. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1972**, *36*(3-4), 324–334, doi:10.1007/BF01249863.
68. Harrap, K.A.; Longworth, J.F.; Tinsley, T.W.; Brown, K.W. A non-inclusion virus of *Gonometa podooarpi* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *J. Invertebr. Pathol.* **1966**, *8*(2), 270–272.
69. Scherer, W.F.; Hurlbut, H.S. Nodamura virus from Japan: a new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *Am. J. Epidemiol.* **1967**, *86* (2), 271–285, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120737.
70. Knudson, D.L.; Buckley, S.M. Invertebrate cell culture methods for the study of invertebrate-associated animal viruses [Includes insects]. *Methods in virology.* **1977**.
71. Bergoin, M.; Dales, S. Comparative observations on poxviruses of invertebrates and vertebrates. In *Comparative Virology*; Maramorosch, K., Kurstak, E., Eds.; Academic Press: New York, 1971, *6*, pp. 169–205.
72. Hall, R.L.; Li, Y.; Feller, J.; Moyer, R.W. The Amsacta moorei entomopoxvirus spheroidin gene is improperly transcribed in vertebrate poxviruses. *Virology* **1996**, *224*(2), 427–436, doi:10.1006/viro.2000.0449.
73. Wood, H.A.; Granados, R.R. Genetic ally engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, *45*(1), 69–87, doi:https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.000441.
74. Martignoni, M.E.; Iwai, P.J. A catalogue of viral diseases of insects, mites, and ticks. In *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*; Burges, H.D., Ed.; Academic Press: London (UK), 1981; pp. 897–911 ISBN 0121433609.
75. Slack, J.; Arif, B.M. The Baculoviruses occlusion derived virus : virion structure and function. *Adv. Virus Res.* **2006**, *69*, 99–165, doi:10.1016/S0065-3527(06)69003-9.
76. Murphy, F.A.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Ghabrial, S.A.; Jarvis, A.W.; Martelli, G.P.; Summers, M.D. Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **1995**, *10*(1), 586.
77. Granados, R.R. Infectivity and mode of action of Baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, *22*(7), 1377–1405, doi:10.1002/bit.260220707.
78. Harrison, R.L.; Herniou, E.A.; Jehle, J.A.; Theilmann, D.A.; Burand, J.P.; Becnel, J.J.; Krell, P.J.; Van Oers, M.M.; Mowery, J.D.; Bauchan, G.R. ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*(9), 1185–1186, doi:10.1099/jgv.0.001107.
79. Blissard, G.W.; Theilmann, D.A. Baculovirus entry and egress from insect cells. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 113–139, doi:10.1146/annurev-virology.

80. *Atlas of invertebrate viruses*; Adams, J.R., Bonami, J.R., Eds.; CRC Press Inc: Boca Raton (Florida), 1991; ISBN 9781138505957.
81. Yu, I.L.; Bray, D.; Lin, Y.C.; Lung, O. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewer nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* **2009**, 90(6), 1499–1504, doi:10.1099/vir.0.009035-0.
82. Coch, R.; Leube, R. Intermediate Filaments and Polarization in the Intestinal Epithelium. *Cells* **2016**, 5(3), 32-undefined, doi:10.3390/cells5030032.
83. Washburn, J.O.; Trudeau, D.; Wong, J.F.; Volkman, L.E. Early pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Helicoverpa zea* single nucleopolyhedrovirus in *Heliothis virescens*: A comparison of the “M” and “S” strategies for establishing fatal infection. *J. Gen. Virol.* **2003**, 84(2), 343–351, doi:10.1099/vir.0.18701-0.
84. Granados, R.R.; Lawler, K.A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* **1981**, 108(2), 297–308, doi:10.1016/0042-6822(81)90438-4
85. Washburn, J.O.; Chan, E.Y.; Volkman, L.E.; Aumiller, J.J.; Jarvis, D.L. Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. *J. Virol.* **2003**, 77(1), 280–290, doi:10.1128/jvi.77.1.280-290.2003.
86. Washburn, J.O.; Lyons, E.H.; Haas-Stapleton, E.J.; Volkman, L.E. Multiple nucleocapsid packaging of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic Hoopes, R.R.; Rohrmann, G.F. *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88(10), 4513–4517, doi:10.1073/pnas.88.10.4513.
87. Hoopes, R.R.; Rohrmann, G.F. *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88(10), 4513–4517, doi:10.1073/pnas.88.10.4513.
88. Lu, A.; Carstens, E.B. Immediate-early baculovirus genes transactivate the *p143* gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **1993**, 195(2), 710–718, doi:10.1006/VIRO.1993.1422.
89. George, S. Use and control of co-expression in the baculovirus-insect cell system for the production of multiple proteins and complex biologics, Thèse de doctorat. University of Waterloo (Canada), 2016, 165.
90. Guarino, L.A.; Summers, M.D. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* **1986**, 57(2), 563–571.
91. Passarelli, A.L.; Miller, L.K. Identification and characterization of *lef-1*, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. *J. Virol.* **1993**, 67(6), 3481–8.
92. Chiang, A.S.; Yen, D.F.; Peng, W.K. Defense Reaction of Midgut Epithelial Cells in the Rice Moth Larva (*Corcyra cephalonica*) Infected with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **1986**,

- 47(3), 333–339.
93. Kirkpatrick, B.A.; Washburn, J.O.; Engelhard, E.K.; Volkman, L.E. Primary Infection of Insect Tracheae by *Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* **1994**, 203(1), 184–186, doi:10.1006/VIRO.1994.1472.
 94. Palomares, L.A.; Realpe, M.; Ramírez, O.T. An overview of cell culture engineering for the insect cell-baculovirus expression vector system (BEVS). 2015; pp. 501–519.
 95. NCBI (National Center for Biotechnology Information) *Baculoviridae*. Disponible en ligne : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10442> (accessed on Feb 5, 2020).
 96. Rohrmann *Baculovirus Molecular Biology 4th* Bethesda Ed; 2019.
 97. Vanarsdall, A.L.; Okano, K.; Rohrmann, G.F. Characterization of the replication of a baculovirus mutant lacking the DNA polymerase gene. *Virology* **2005**, 331(1), 175–180, doi:10.1016/J.VIROL.2004.10.024.
 98. Wang, M.; Tuladhar, E.; Shen, S.; Wang, H.; van Oers, M.M.; Vlak, J.M.; Westenberg, M. Specificity of baculovirus P6.9 basic DNA-binding proteins and critical role of the c terminus in virion formation. *J. Virol.* **2010**, 84(17), 8821–8828, doi:10.1128/jvi.00072-10.
 99. Croizier, G.; Croizier, L.; Argaud, O.; Poudevigne, D. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91(1), 48–52, doi:10.1073/pnas.91.1.48.
 100. Kelly, B.J.; King, L.A.; Possee, R.D. Introduction to baculovirus molecular biology. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2016; 1350, pp. 25–50.
 101. Passarelli, L.; Miller, L. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*. *J. Virol.* **1993**, 67(4), 2149–2158.
 102. Prikhod'ko, E.A.; Miller, L.K. The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. *J. Virol.* **1999**, 73(8), 6691–6699.
 103. Hodgson, J.J.; Arif, B.M.; Krell, P.J. Interaction of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus cathepsin protease progenitor (proV-CATH) with insect baculovirus chitinase as a mechanism for proV-CATH cellular retention. *J. Virol.* **2011**, 85(8), 3918–3929, doi:10.1128/jvi.02165-10.
 104. Ono, C.; Okamoto, T.; Abe, T.; Matsuura, Y. Baculovirus as a tool for gene delivery and gene therapy. *Viruses* **2018**, 10(9), 510, doi:10.3390/v10090510.
 105. Boogaard, B.; Van Oers, M.M.; Van Lent, J.W.M. An advanced view on baculovirus per os infectivity factors. *Insects* **2018**, 9(3), 16, doi:10.3390/insects9030084.
 106. Biswas, S.; Willis, L.G.; Fang, M.; Nie, Y.; Theilmann, D.A. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus AC141 (Exon0), a potential E3 ubiquitin ligase, interacts with viral ubiquitin and AC66 to facilitate nucleocapsid egress. *J. Virol.* **2018**, 92(3), 1713–1730, doi:10.1128/JVI.01713-17.

107. Clem, R.; Fechheimer, M.; Miller, L. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*. **1991**, 254(5036), 1388–1390, doi:10.1126/science.1962198.
108. Gasque, S.N.; van Oers, M.M.; Ros, V.I. Where the baculoviruses lead, the caterpillars follow: baculovirus-induced alterations in caterpillar behaviour. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2019**, 33, 30–36, doi:10.1016/J.COIS.2019.02.008.
109. Passarelli, A.L. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology* **2011**, 411(2), 383–392, doi:10.1016/J.VIROL.2011.01.009.
110. Moser, B.A.; Becnel, J.J.; White, S.E.; Afonso, C.; Kutish, G.; Shanker, S.; Almira, E. Printed in great Britain morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family *Baculoviridae*. *J. Gen. Virol.* **2001**, 82(2), 283–297, doi:10.1099/0022-1317-82-2-283.
111. Misof, B.; Liu, S.; Meusemann, K.; Peters, R.S.; Donath, A.; Mayer, C.; Frandsen, P.B.; Ware, J.; Flouri, T.; Beutel, R.G.; *et al.* Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*. **2014**, 346(6210), 763–767, doi:10.1126/science.1257570.
112. Nagamine, T.; Sako, Y. A role for the anti-viral host defense mechanism in the phylogenetic divergence in baculovirus evolution. *Plos one*. **2016**, 11(5), 9, doi:10.1371/journal.pone.0156394.
113. Shapiro, D.I.; Fuxa, J.R.; Braymer, H.D.; Pashley, D.P. DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **1991**, 58(1), 96–105, doi:10.1016/0022-2011(91)90167-O.
114. Maruniak, J.E.; Brown, S.E.; Knudson, D.L. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology* **1984**, 136(1), 221–234, doi:10.1016/0042-6822(84)90261-7.
115. Ebling, P.M.; Kaupp, W.J. Differentiation and comparative activity of six isolates of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*, Hübner. *J. Invertebr. Pathol.* **1995**, 66(2), 198–200, doi:10.1006/JIPA.1995.1084.
116. Erlandson, M.A. Genetic variation in field populations of baculoviruses: Mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virol. Sin.* **2009**, 24(5), 458–469, doi:10.1007/s12250-009-3052-1.
117. Ayres, M.D.; Howard, S.C.; Lopez-Ferber, M.; Lopez-Ferber, M.; Possee, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **1994**, 202(2), 586–605, doi:10.1006/viro.1994.1380.
118. Takatsuka, J.; Okuno, S.; Nakai, M.; Kunimi, Y. Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* **2003**, 26(1), 32–39, doi:10.1016/S1049-9644(02)00113-5.
119. Kamiya, K.; Zhu, J.; Murata, M.; Laviña-Caoili, B.A.; Ikeda, M.; Kobayashi, M.; Kawamura, S. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biol. Control* **2004**, 31(1), 38–48, doi:10.1016/j.biocontrol.2004.04.003.120.

Cooper, D.; Cory, J.S.; Myers,

- J.H. Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyhedroviruses infecting cyclic populations of western tent caterpillars. *Mol. Ecol.* **2003**, 12, 881–890, doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01785.x.
121. Graham, R.I.; Tyne, W.I.; Possee, R.D.; Sait, S.M.; Hails, R.S. Genetically variable nucleopolyhedroviruses isolated from spatially separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) in Orkney. *J. Invertebr. Pathol.* **2004**, 87(1), 29–38, doi:10.1016/j.jip.2004.06.002.
 122. Cory, J.S.; Green, B.M.; Paul, R.K.; Hunter-Fujita, F. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invertebr. Pathol.* **2005**, 89(2), 101–111, doi:10.1016/j.jip.2005.03.008.
 123. Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Watt, A.D.; Hails, R.S.; Cory, J.S. Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. *Evol. Ecol. Res.* **2001**, 3(6), 687–701.
 124. Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Hartley, S.E.; Hails, R.S.; Cory, J.S. Differential selection of baculovirus genotypes mediated by different species of host food plant. *Ecol. Lett.* **2002**, 5(4), 512–518, doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00338.x.
 125. Miller, D.W. Brevet : Mixed baculovirus compositions and uses thereof 1991, 6.
 126. Hamblin, M.; Van Beek, N.A.M.; Hughes, P.R.; Wood, H.A. Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedrin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56(10), 3057–3062, doi:10.1128/AEM.56.10.3057-3062.1990.
 127. Bull, J.C.; Godfray, H.C.J.; O'Reilly, D.R. Persistence of an occlusion-negative recombinant nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* indicates high multiplicity of cellular infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67(3-12), 5204–5209, doi:10.1128/AEM.67.11.5204-5209.2001.
 128. Bull, J.C.; Godfray, H.C.J.; O'Reilly, D.R. A few-polyhedra mutant and wild-type nucleopolyhedrovirus remain as a stable polymorphism during serial coinfection in *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69(4), 2052–2057, doi:10.1128/AEM.69.4.2052-2057.2003.
 129. Godfray, H.C.J.; O'Reilly, D.R.; Briggs, C.J. A model of Nucleopolyhedrovirus (NPV) population genetics applied to co-occlusion and the spread of the few polyhedra (FP) phenotype. *R. Soc.* **1997**, 264(1380), 315–322, doi:10.1098/rspb.1997.0045.
 130. Beperet, I.; Irons, S.L.; Simón, O.; King, L.A.; Williams, T.; Possee, R.D.; Lopez-Ferber, M.; Caballero, P. Superinfection exclusion in alphabaculovirus infections is concomitant with actin reorganization. *J. Virol.* **2014**, 88(6), 3548–3556, doi:10.1128/JVI.02974-13.
 131. 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(11), 2423–2430, doi:10.1099/0022-1317-66-11-2423.
 132. Crook, N.E. Restriction enzyme analysis of granulosis viruses isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassicae*. *J. Gen. Virol.* **1986**, 67(4), 781–787, doi:10.1099/0022-1317-67-4-781.

133. Lichtenstein J-L.; Grassé P. P. La Teigne de la pomme de terre (*Phthorimea operculella* Zell.) dans le département de l'Hérault [Lep. Tineidae]. *Bull. la Société Entomol. Fr.* **1921**, 26(18), 267–268.
134. Steinhaus, E.A.; Marsh, G.A. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. *J. Invertebr. Pathol.* **1967**, 9(3), 436–438.
135. Reed, E.M.; Springett, B.P. Large-scale field testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep. Gelechiidae)). *Bull. Entomol. Res.* **1971**, 61(2), 223–233, doi:10.1017/S0007485300057746.
136. Briese, D.T.; Mende, H.A. Differences in susceptibility to a granulosis virus between field populations of the potato moth, *Phthorimaea Operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bull. Entomol. Res.* **1981**, 71(1), 11–18, doi:10.1017/S0007485300050987.
137. Vickers, J.M.; Cory, J.S.; Entwistle, P.F. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *J. Invertebr. Pathol.* **1991**, 57(3), 334–342, doi:10.1016/0022-2011(91)90137-F.
138. Léry, X.; Abol-Ela, S.; Giannotti, J. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: Restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained *in vitro*. *Acta Virol.* **1998**, 42(1), 13–21.
139. Parnell, M.; Grzywacz, D.; Jones, K.; Brown, M.; Oduor, G.; Ong'aro, J. The strain variation and virulence of granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. *J. Invertebr. Pathol.* **2002**, 79(3), 192–196, doi:10.1016/S0022-2011(02)00001-0.
140. Goto, C.; Minobe, Y.; Iizuka, T. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. *J. Gen. Virol.* **1992**, 73(6), 1491–1497, doi:10.1099/0022-1317-73-6-1491.
141. Falcon, L.A.; Hess, R.T. Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **1985**, 45(3), 356–359, doi:10.1016/0022-2011(85)90115-6.
142. Berling, M. Durabilité du contrôle du carpocapse des pommes et des poires (*Cydia pomonella*) avec le virus de la granulose (CpGV): Résistance versus virulence, Thèse de doctorat. Université de Pau et des pays de l'Adour, 2009, 237.
143. Vargas-Osuna, E.; Aldebis, H.K.; Caballero, P.; Lipa, J.J.; Santiago-Alvarez, C. A Newly Described Baculovirus (Subgroup B) from *Ocnogyna baetica* (Rambur) (Lepidoptera: Arctiidae) in Southern Spain. *J. Invertebr. Pathol.* **1994**, 63(1), 31–36, doi:10.1006/JIPA.1994.1006.
144. Sciocco-Cap, A.; Parola, A.D.; Goldberg, A. V.; Ghiringhelli, P.D.; Romanowski, V. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67(8), 3702–3706, doi:10.1128/AEM.67.8.3702-3706.2001.

145. Kawamoto, F.; Asayama, T. Studies on the arrangement patterns of nucleocapsids within the envelopes of nuclear-polyhedrosis virus in the fat-body cells of the brown tail moth, *Euproctis similis*. *J. Invertebr. Pathol.* **1975**, 26(1), 47–55, doi:10.1016/0022-2011(75)90168-8.
146. Flipsen, J.T.M.; Martens, J.W.M.; Van Oers, M.M.; Vlak, J.M.; Van Lent, J.W.M. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* **1995**, 208(1), 328–335, doi:10.1006/VIRO.1995.1156.
147. Escribano, A.; Williams, T.; Goulson, D.; Cave, R.D.; Chapman, J.W.; Caballero, P. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* **1999**, 92(5), 1079–1085, doi:10.1093/jee/92.5.1079.
148. Kroschel, J.; Fritsch, E.; Huber, J. Biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* zeller) in the Republic of Yemen using granulosis virus: Biochemical characterization, pathogenicity and stability of the virus. *Biocontrol Sci. Technol.* **1996**, 6(2), 207–216, doi:10.1080/09583159650039395.
149. Van Oers, M.; Vlak, J. Baculovirus Genomics. *Curr. Drug Targets* **2007**, 8(10), 1051–1068, doi:10.2174/138945007782151333.
150. Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Taulemesse, J.M.; Caballero, P. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* **2008**, 44(3), 321–330, doi:10.1016/j.biocontrol.2007.12.005.
151. Alizon, S.; Hurford, A.; Mideo, N.; Van Baalen, M. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: History, current state of affairs and the future. *J. Evol. Biol.* **2009**, 22(2), 245–259, doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x.
152. Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) Resistances. Disponible en ligne : <https://www.irac-online.org/about/resistance/> (accessed on Dec 11, 2019).
153. Livadas, G.A.; Georgopoulos, G. Development of resistance to DDT by *Anopheles sacharovi* in greece. *Bull. World Heal. Organ.* **1953**, 8(4), 497–511.
154. Sparks, T.C.; Nauen, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, 121, 122–128, doi:10.1016/J.PESTBP.2014.11.014.
155. Lockwood, J.A.; Sparks, T.C.; Story, R.N. Evolution of insect resistance to insecticides: A reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **1984**, 30(4), 41–51, doi:https://doi.org/10.1093/besa/30.4.41.
156. Zago, H.B.; Siqueira, H.A.A.; Pereira, E.J.G.; Picanço, M.C.; Barros, R. Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Manag. Sci.* **2014**, 70(3), 488–495, doi:10.1002/ps.3600.
157. Corbel, V.; N'Guessan, R. Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In *Anopheles mosquitoes - New insights into*

- malaria vectors*; InTech, 2013; pp. 579–635.
158. Weill, M.; Lutfalla, G.; Mogensen, K.; Chandre, F.; Berthomieu, A. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **2003**, 423(6936), 136–137, doi:10.1038/423136b.
 159. Alon, M.; Alon, F.; Nauen, R.; Morin, S. Organophosphates resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 38(10), 940–949, doi:10.1016/J.IBMB.2008.07.007.
 160. Rinkevich, F.D.; Du, Y.; Dong, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2013**, 106(3), 93–100, doi:10.1016/j.pestbp.2013.02.007.
 161. Andreev, D.; Kreitman, M.; Phillips, T.W.; Beeman, R.W.; French-Constant, R.H. Multiple origins of cyclodiene insecticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Mol Evol* **1999**, 48(5), 615–624, doi:10.1007/pl00006504.
 162. Wondji, C.S.; Dabire, R.K.; Tukur, Z.; Irving, H.; Djouaka, R.; Morgan, J.C. Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, 41(7), 484–491, doi:10.1016/J.IBMB.2011.03.012.
 163. Sheng, C.W.; Casida, J.E.; Durkin, K.A.; Chen, F.; Han, Z.J.; Zhao, C.Q. Fiprole insecticide resistance of *Laodelphax striatellus*: electrophysiological and molecular docking characterization of A2'N RDL GABA receptors. *Pest Manag. Sci.* **2018**, 74(11), 2645–2651, doi:10.1002/ps.5059.
 164. Perry, T.; Heckel, D.G.; McKenzie, J.A.; Batterham, P. Mutations in Dα1 or Dβ2 nicotinic acetylcholine receptor subunits can confer resistance to neonicotinoids in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 38(5), 520–528, doi:10.1016/J.IBMB.2007.12.007.
 165. Bergé, J.-B.; Feyereisen, R.; Amichot, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *R. Soc.* **1998**, 353(1373), 1701–1705, doi:https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0321.
 166. Wang, X.; Huang, Q.; Hao, Q.; Ran, S.; Wu, Y.; Cui, P.; Yang, J.; Jiang, C.; Yang, Q. Insecticide resistance and enhanced cytochrome P450 monooxygenase activity in field populations of *Spodoptera litura* from Sichuan, China. *Crop Prot.* **2018**, 106, 110–116, doi:10.1016/J.CROPRO.2017.12.020.
 167. Bhatt, P.; Bhatt, K.; Huang, Y.; Lin, Z.; Chen, S. Esterase is a powerful tool for the biodegradation of pyrethroid insecticides. *Chemosphere* **2019**, 244(2020), 125507, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125507.
 168. Pavlidi, N.; Vontas, J.; Van Leeuwen, T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2018**, 27, 97–102, doi:10.1016/J.COIS.2018.04.007.

169. Chaufaux, J. Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures: le point sur *Bacillus thuringiensis*. *Insectes* **1995**, 97(2), 6.
170. Loudhaief, R. Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile, Thèse de doctorat. Université de Nice Sophia Antipolis, 2016, 214.
171. Bravo, A.; Gill, S.S.; Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **2007**, 49(4), 423–435, doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
172. Bravo, A.; Gómez, I.; Porta, H.; García-Gómez, B.I.; Rodriguez-Almazan, C.; Pardo, L.; Soberón, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* CRY toxins insecticidal activity. *Microb. Biotechnol.* **2013**, 6(1), 17–26, doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x.
173. Tabashnik, B.E.; Brévault, T.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. *Nat. Biotechnol.* **2013**, 31(6), 510–521, doi:10.1038/nbt.2597.
174. Briese, D.T. Genetic basis for resistance to a granulosis virus in the potato moth *Phthorimaea operculella*. *J. Invertebr. Pathol.* **1982**, 39(2), 215–218, doi:10.1016/0022-2011(82)90013-1.
175. Croizier, G.; Croizier, L.; Biache, G.; Chaufaux, J. Évolution de la composition génétique et du pouvoir infectieux du baculovirus de *Mamestra brassicae* L. au cours de 25 multiplications successives sur les larves de la noctuelle du chou. *Entomophaga* **1985**, 30(4), 365–374, doi:https://doi.org/10.1007/BF02372342.
176. Kaomini, M.; Roush, R.T. Absence of response to selection for resistance to nucleopolyhedrosis virus in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* **1988**, 23(4), 379–382.
177. Abot, A.R.; Moscardi, F.; Fuxa, J.R.; Sosa-Gómez, D.R.; Richter, A.R. Development of resistance by *Anticarsia gemmatilis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biol. Control* **1996**, 7(75), 126–130, doi:10.1006/bcon.1996.0075.
178. Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C.; Huber, J. Codling moth granulovirus: First indication of variations in the susceptibility of local codling moth populations. *Nachrichtenblatt des Dtsch. Pflanzenschutzdienstes* **2005**, 57(2), 29–34.
179. Sauphanor, B.; Berling, M.; Toubon, J.-F.; Reyes, M.; Delnatte, J. Carpacap des pommes cas de résistance aux virus de la granuloose dans le Sud-Est. *Phytoma* **2006**, 590, 24–27.
180. 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(9), 641–649, doi:10.1111/jen.12046.
181. Rezapanah, M.; Shojai-Estabragh, S.; Huber, J.; Jehle, J.A. Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. *J. Pest Sci. (2004)*. **2008**, 81(4), 187–191, doi:10.1007/s10340-008-0204-2.
182. Eberle, K.E.; Asser-Kaiser, S.; Sayed, S.M.; Nguyen, H.T.; Jehle, J.A. Overcoming the resistance

- of codling moth against conventional *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, 98(3), 293–298, doi:10.1016/j.jip.2008.03.003.
183. 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.* **2014**, 111(44), 15711–15716, doi:10.1073/pnas.1411089111.
 184. 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. Microbiol.* **2009**, 75(4), 925–930, doi:10.1128/AEM.01998-08.
 185. Sauer, A.J.; Schulze-Bopp, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Jehle, J.A. A third type of resistance to *Cydia pomonella* granulovirus in codling moths shows a mixed Z-linked and autosomal inheritance pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, 83(17), e01036-17, doi:10.1128/AEM.01036-17.
 186. Hoover, K.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. *J. Insect Physiol.* **2000**, 46(6), 999–1007, doi:10.1016/S0022-1910(99)00211-5.
 187. Iwata, K.; Haas-Stapleton, E.; Kunimi, Y.; Inoue, M.N.; Nakai, M. Midgut-based resistance to oral infection by a nucleopolyhedrovirus in the laboratory-selected strain of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Gen. Virol.* **2017**, 98(2), 296–304, doi:10.1099/jgv.0.000684.
 188. Zhang, P.; Wang, J.; Lu, Y.; Hu, Y.; Xue, R.; Cao, G.; Gong, C. Resistance of transgenic silkworm to BmNPV could be improved by silencing *ie-1* and *lef-1* genes. *Gene Ther.* **2014**, 21(1), 81–88, doi:10.1038/gt.2013.60.
 189. Watanabe, H. Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. *Curr. Sci.* **2002**, 83(4), 439–446.
 190. Tavares, J.; Bravo, J.P.; Gimenes, F.; Neto, Q.A.; Fiorini, A.; Fernandez, M.A. Differential structure of the intronic promoter of the *Bombyx mori* A3 actin gene correlated with silkworm sensitivity/resistance to nucleopolyhedrovirus. *Genet. Mol. Res.* **2011**, 10(1), 471–481, doi:10.4238/vol10-1gmr978.
 191. 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.; *et al.* Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science*. **2007**, 317(5846), 1916–1918, doi:10.1126/science.1146542.
 192. McNeil, J.; Cox-Foster, D.; Slavicek, J.; Hoover, K. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenged with baculovirus. *J. Insect Physiol.* **2010**, 56(9), 1167–1177, doi:10.1016/j.jinsphys.2010.03.020.
 193. David, W.A.L.; Gardiner, B.O.C. Resistance of *Pieris brassicae* (Linnaeus) to granulosus virus and the virulence of the virus from different host races. *J. Invertebr. Pathol.* **1965**, 7(3), 285–290,

doi:10.1016/0022-2011(65)90003-0.

194. Boots, M.; Begon, M. Trade-Offs with Resistance to a Granulosis Virus in the Indian Meal Moth, Examined by a Laboratory Evolution Experiment. *Functional Ecology*. **1993**; 7(5), 528–534, doi:10.2307/2390128.
195. Reichelderfer, C.F.; Benton, C.V. Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **1974**, 23(3), 378–382, doi:10.1016/0022-2011(74)90105-0.
196. Fuxa, J.R.; Mitchell, F.L.; Richter, R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* [lep. : noctuidae] to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. *Entomophaga* **1988**, 33(1), 55–63, doi:10.1007/BF02372313.
197. Reeson, A.F.; Wilson, K.; Gunn, A.; Hails, R.S.; Goulson, D. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *R. Soc.* **1998**, 265(1407), 1787–1791, doi:10.1098/rspb.1998.0503.
198. Milks, M.L.; Myers, J.H. Cabbage Looper Resistance to a Nucleopolyhedrovirus Confers Cross-Resistance to Two Granuloviruses. *Environ. Entomol.* **2003**, 32(2), 286–289, doi:10.1603/0046-225x-32.2.286.
199. Cooper, D.; Eleftherianos, I. Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. *Front. Immunol.* **2017**, 8, 539, doi:10.3389/fimmu.2017.00539.
200. Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D.R.; Paro, F.E.; Soldorio, I.L. Fluorescent Brighteners Improve *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) Activity on AgMNPV-Susceptible and Resistant Strains of the Insect. *Biol. Control* **2001**, 20(3), 247–253, doi:10.1006/BCON.2000.0904.
201. Asser-Kaiser, S.; Radtke, P.; El-Salamouny, S.; Winstanley, D.; Jehle, J.A. Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. *Virology* **2011**, 410(2), 360–367, doi:10.1016/j.virol.2010.11.021.
202. Levy, S.M.; Falleiros, Â.M.F.; Moscardi, F.; Gregório, E.A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatilis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, 96(2), 183–186, doi:10.1016/J.JIP.2007.04.007.
203. Evans, J.D.; Spivak, M. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, 103, S62–S72, doi:10.1016/J.JIP.2009.06.019.
204. Kingsolver, M.B.; Huang, Z.; Hardy, R.W. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **2013**, 425(24), 4921–4936, doi:10.1016/j.jmb.2013.10.006.
205. Xu, J.; Cherry, S. Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, 42(1), 67–84, doi:10.1016/j.dci.2013.05.002.
206. Merklings, S.H.; Van Rij, R.P. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *drosophila* and mosquito. *J. Insect Physiol* **2013**, 59(2), 159–170, doi:10.1016/j.jinsphys.2012.07.004.
207. Nayak, A.; Tassetto, M.; Kunitomi, M.; Andino, R. RNA interference-mediated intrinsic antiviral

- immunity in invertebrates. In *Intrinsic Immunity*; Springer: Berlin, 2013; 371, pp. 183–200.
208. Bronkhorst, A.W.; Van Rij, R.P. The Long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *7*, 19–28, doi:10.1016/j.coviro.2014.03.010.
209. Sarnow, P.; Jopling, C.L.; Norman, K.L.; Schütz, S.; Wehner, K.A. MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*(9), 651–659, doi:10.1038/nrmicro1473.
210. Ribeiro, C.; Brehélin, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* **2006**, *52*(5), 417–429, doi:10.1016/J.JINSPHYS.2006.01.005.
211. Clarke, T.E.; Clem, R.J. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. *Int. Rev. Immunol.* **2003**, *22*(5-6), 401–424, doi:10.1080/08830180390211042..
212. Trudeau, D.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. Central role of hemocytes in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J. Virol.* **2001**, *75*(2), 996–1003, doi:10.1128/jvi.75.2.996-1003.2001.
213. Kirkpatrick, B.A.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *72*(1), 63–72, doi:10.1006/JIPA.1997.4752.
214. Rigby, M.C.; Hechinger, R.F.; Stevens, L. Why should parasite resistance be costly? *Trends Parasitol.* **2002**, *18*(3), 116–120, doi:10.1016/s1471-4922(01)02203-6.
215. Cabodevilla, O.; Villar, E.; Virto, C.; Murillo, R.; Williams, T.; Caballero, P. Intra- and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: Adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*(9), 2954–2960, doi:10.1128/AEM.02762-10.
216. Monobrullah, M.; Shankar, U. Sub-lethal effects of SpltMNPV infection on developmental stages of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Sci. Technol.* **2008**, *18*(4), 431–437, doi:10.1080/09583150801994137.
217. Pimentel, D. Personal observations; personal communications from personnel of the Arizona Game and Fish Department. *Science.* **1968**, *159*(3822), 1432–7, doi: 10.2307/1724005.
218. Briesse, D.T.; Mende, H.A. Selection for increased resistance to a granulosis virus in the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bull. Entomol. Res.* **1983**, *73*(1), 1–9, doi:10.1017/S0007485300013730.
219. Fuxa, J.R.; Richter, A.R. Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatilis*. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *71*(2), 159–164, doi:10.1006/jipa.1997.4724.
220. Berling, M.; Sauphanor, B.; Bonhomme, A.; Siegwart, M.; Lopez-Ferber, M. A single sex-linked dominant gene does not fully explain the codling moth's resistance to granulovirus. *Pest Manag. Sci.* **2013**, *69*(11), 1261–1266, doi:10.1002/ps.3493.
221. 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(2), 136–142, doi:10.1016/j.jip.2012.07.005.
222. Graillot, B.; Blachere-Lopez, C.; Besse, S.; Siegwart, M.; Lopez-Ferber, M. Measuring the fitness cost of type I resistance breaking by CpGV. In Proceedings of the Is IPM ready for Microbial Control Agents?; Tarasco, E., Jehle, J., Burjanadze, M., Ruiu, L., Puza, V., Quesada-Moraga, E., Lopez-Ferber, M., Stephan, D., Eds.; IOBC-WPRS Bulletin Vol. 129: Tbilisi (Georgie), 2017; pp. 163–169.
 223. Godoy, D.N.; Führ, F.M.; Stacke, R.F.; Muraro, D.S.; Marçon, P.; Popham, H.J.R.; Bernardi, O. No cross-resistance between ChinNPV and chemical insecticides in *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2019**, 164, 66–68, doi:10.1016/j.jip.2019.05.001.
 224. Muraro, D.S.; Giacomelli, T.; Stacke, R.F.; Godoy, D.N.; Marçon, P.; Popham, H.J.R.; Bernardi, O. Baseline Susceptibility of Brazilian Populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to *C. includens* Nucleopolyhedrovirus and Diagnostic Concentration for Resistance Monitoring. *J. Econ. Entomol.* **2019**, 112(1), 349–354, doi:10.1093/jee/toy361.
 225. Ray, A.M.; Arnold, R.A.; Swift, I.; Schapker, P.A.; McCann, S.; Marshall, C.J.; McElfresh S.; Millar, J.G. (R)-Desmolactone Is a Sex Pheromone or Sex Attractant for the Endangered Valley Elderberry Longhorn Beetle *Desmocerus californicus dimorphus* and Several Congeners (Cerambycidae: Lepturinae). *PloS One.* **2014**, 9(12), e115498, doi:10.1371/journal.pone.011549.
 226. Retamal, R.; Zaviezo, T.; Malausa, T.; Fauvergue, X.; Le Goff, I.; Toleubayev, K. Genetic analyses and occurrence of diploid males in field and laboratory populations of *Mastrus ridens* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of the codling moth. *Biol. Control* **2016**, 101, 69–77, doi:10.1016/J.BIOCONTROL.2016.06.009.
 227. Food and agricultural commodities production (FAOSTAT 2018) Disponible en ligne : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed on Feb 25, 2019).
 228. Solomon, M.G.; Cross, J. V.; Fitzgerald, J.D.; Campbell, C.A.M.; Jolly, R.L.; Olszak, R.W.; Niemczyk, E.; Vogt, H. Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe - 3. Predators. *Biocontrol Sci. Technol.* **2000**, 10(3), 91–128, doi:10.1080/09583150029260.
 229. Graillot, B. Analyse de la durabilité de la lutte biologique à l'aide de baculovirus, Thèse de doctorat. Ecole des Mines de Saint Etienne, 2015, 288.
 230. Andermatt Biocontrol Codling moth. Disponible en ligne : <https://www.andermtbiocontrol.com/> (accessed on Jul 15, 2020).
 231. Pajač, I.; Pejic, I.; Barić, B. Codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)-major pest in apple production: an overview of its biology, resistance, genetic structure and control strategies. *Agric. conspec. sci.* **2011**, 76(2), 87–93.
 232. Lacey, L.A.; Shapiro-Ilan, D.I. Microbial control of insect pests in temperate orchard systems: potential for incorporation into IPM. *Annu. Rev. Entomol.* **2008**, 53(1), 121–144, doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093419.
 233. Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la foret *Enquête Pratiques phytosanitaires en*

- arboriculture 2012 Nombre de traitements*; Montreuil-sous-Bois (France), 2014.
234. Tanada, Y. Granulosis virus of codling moth *Carpocapsa pomonella* (linnaeus) (Olethreutidae Lepidoptera). *J. Insect Pathol.* **1964**, 6(3), 378..
 235. Lacey, L.A.; Thomson, D.; Vincent, C.; Arthurs, S.P. Codling moth granulevirus: A comprehensive review. *Biocontrol Sci. Technol.* **2008**, 18(7), 639–663, doi:10.1080/09583150802267046.
 236. Hajek, A.E.; Eilenberg, J. *Natural Enemies*. Cambridge University Press, 2018; ISBN 9781107280267.
 237. Brand, G. Granulovirus. *Andermatt Biocontrol J.* **2018**, 8–9.
 238. Eberle, K.E.; Sayed, S.; Rezapanah, M.; Shojai-Estabragh, S.; Jehle, J.A. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *J. Gen. Virol.* **2009**, 90(3), 662–671, doi:10.1099/vir.0.006999-0.
 239. Wennmann, J.T.; Radtke, P.; Eberle, K.E.; Alletti, G.G.; Jehle, J.A. Deciphering single nucleotide polymorphisms and evolutionary trends in isolates of the *Cydia pomonella* granulovirus. *Viruses* **2017**, 9(8), 227, doi:10.3390/v9080227.
 240. Jehle, J.A.; Schulze-Bopp, S.; Undorf-Spahn, K.; Fritsch, E. Evidence for a second type of resistance against *Cydia pomonella* granulovirus in field populations of codling moths. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, 83(2), 1–13, doi:10.1128/AEM.02330-16.
 241. Alletti, G.G.; Sauer, A.J.; Weihrauch, B.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Wennmann, J.T.; Jehle, J.A. Using next generation sequencing to identify and quantify the genetic composition of resistance- breaking commercial isolates of *Cydia pomonella* granulovirus. *Viruses* **2017**, 9(9), 250, doi:10.3390/v9090250.
 242. Brand, G.; Zingg, D.; Querrioux, A. Virus de la granulose du carpocapse. *Phytoma* **2017**, 702, 47–49.
 243. Graillot, B.; Bayle, S.; Blachere-Lopez, C.; Besse, S.; Siegwart, M.; Lopez-Ferber, M. Biological characteristics of experimental genotype mixtures of *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV): Ability to control susceptible and resistant pest populations. *Viruses* **2016**, 8(5), 147, doi:10.3390/v8050147.
 244. Muñoz, D.; Caballero, P. Persistence and Effects of Parasitic Genotypes in a Mixed Population of the *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* **2000**, 19(3), 259–264, doi:10.1006/BCON.2000.0864.
 245. Alizon, S.; de Roode, J.C.; Michalakakis, Y. Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecol. Lett.* **2013**, 16(4), 556–567, doi:10.1111/ele.12076.
 246. Espinel-Correal, C.; López-Ferber, M.; Zeddani, J.-L.; Villamizar, L.; Gómez, J.; Cotes, A.M.; Léry, X. Experimental mixtures of *Phthorimaea operculella* granulovirus isolates provide high biological efficacy on both *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, 110(3), 375–381, doi:10.1016/j.jip.2012.04.012.

247. Espinel-Correal, C.; L  ry, X.; Villamizar, L.; Gómez, J.; Zedd  m, J.L.; Cotes, A.M.; López-Ferber, M. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76(22), 7617–7625, doi:10.1128/AEM.00999-10.
248. Sepp  l  , O.; Karvonen, A.; Valtonen, E.T.; Jokela, J. Interactions among co-infecting parasite species: A mechanism maintaining genetic variation in parasites? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, 276(1657), 691–697, doi:10.1098/rspb.2008.1229.
249. Sepp  l  , O.; Jokela, J. Do coinfections maintain genetic variation in parasites? *Trends Parasitol.* **2016**, 32(12), 930–938, doi:10.1016/j.pt.2016.08.010.
250. Frank, S.A. Deadly partnerships. *Nature* **2003**, 425(18), 251–252, doi:10.1038/425251a.
251. Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P. Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71(8), 4254–4262, doi:10.1128/AEM.71.8.4254-4262.2005.
252. Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70(9), 5579–5588, doi:10.1128/AEM.70.9.5579-5588.2004.
253. López-Ferber, M.; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2003**, 270(1530), 2249–2255, doi:10.1098/rspb.2003.2498.
254. Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P.; López-Ferber, M. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2006**, 273(1588), 783–790, doi:10.1098/rspb.2005.3394.
255. Cabodevilla, O.; Iba  ez, I.; Simón, O.; Murillo, R.; Caballero, P.; Williams, T. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* **2011**, 56(2), 184–192, doi:10.1016/j.biocontrol.2010.10.007.
256. Vago, C. L'enchaînement des maladies chez les Insectes, Thèse de doctorat. Faculté des Science. Aix-Marseille, France, 1956, 184.
257. Odier, F. Mise en évidence et étude d'un complexe de maladies a parvovirus, baculovirus et iridovirus. *Entomophaga* **1977**, 22(4), 397–404, doi:10.1007/BF02373265.
258. Diallo B. Etude de l'infection    densovirus chez le Lépidoptère *Spodoptera littoralis*, Thèse de doctorat. Université Science Technologique, Montpellier, France, 1978, 141.
259. Hess, R.T.; Summers, M.D.; Falcon, L.A. A Mixed virus infection in midgut cells of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni* larvae. *J. Ultrastruct. Res.* **1978**, 65(3), 253–265, doi:10.1016/S0022-5320(78)80063-X.
260. Kimura, M.; McIntosh, A.H. Dual infection of the *Trichoplusia ni* cell line with the *Chilo iridescent* virus (CIV) and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. In Proceedings of the International Conference on Invertebrate Tissue Culture; Applications in Medicine, Biology,

and Agriculture; 1976.

261. Aizawa, K.E.; Steinhaus, E.A. The nature of infections caused by nuclear-polyhedrosis viruses. In *Insect Pathology V1: An Advanced Treatise (Vol. 1)*; Steinhaus, E.A., Ed.; 1963; pp. 381–412.
262. Goto, C.; Mukawa, S.; Mitsunaga, T. Two year field study to evaluate the efficacy of *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus combined with proteins derived from *Xestia c-nigrum* granulovirus. *Viruses* **2015**, *7*(3), 1062–1078, doi:10.3390/v7031062.
263. Tanada, Y.; Hukuhara, T. Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseuduzetia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **1971**, *17*(1), 116–126.
264. Shapiro, M.; Shepard, B.M. The gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrovirus as a synergist for baculoviruses against beet armyworm, fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Urban Entomol.* **2006**, *23*(4), 243–251.
265. Arends, H.M.; Jehle, J.A. Homologous recombination between the inverted terminal repeats of defective transposon TCp3.2 causes an inversion in the genome of *Cydia pomonella* granulovirus. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 1573–1578, doi:10.1099/0022-1317-83-7-1573.
266. Rohrmann, G.F.; Karplus, P.A. Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evol. Biol.* **2001**, *1*(1), 1.
267. Morse, M.A.; Marriott, A.C.; Nuttall, P.A. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. *Virology* **1992**, *186*(2), 640–646, doi: 10.1016/0042-6822(92)90030-s.
268. Jehle J. A.; Vlak J. M. Transposable Elements in Baculoviruses. In *Transgenic Organisms and Biosafety*; Schmidt, E.R., Hankeln, T., Eds.; Springer: Berlin (Germany), 1996; pp. 31–41 ISBN 978-3-540-61077-9.
269. Morel, D. *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) Disponible en ligne : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/249410 (accessed on Apr 15, 2020).
270. Vaughn, J.L.; Goodwin, R.H.; Tompkins, G.J.; Mccawley, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro.* **1977**, *13*(4), 213–217, doi:10.1007/BF02615077.
271. 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*(10), 2531–2547, doi:10.1099/0022-1317-82-10-2531.
272. Graillot, B.; Besse, S.; Blachère-Lopez, C.; Olivares, J.; Graillot, B.; Olivares, J.; Siegwart, M.; López-Ferber, M. Sequence analysis of CpGV-R5 isolate, able to efficiently control CpGV-M resistant insects: relation between biological activity and genome. *IOBC-WPRS Bull.* **2013**, *90*, 195–199.
273. Marsberg, T.; Jukes, M.D.; Krejmer-Rabalska, M.; Rabalski, L.; Knox, C.M.; Moore, S.D.; Hill, M.P.; Szewczyk, B. Morphological, genetic and biological characterisation of a novel

- alphabaculovirus isolated from *Cryptophlebia peltastica* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, 157, 90–99, doi:10.1016/j.jip.2018.08.006.
274. Guennelon, G.; Audemard, H.; Fremond, J.-C.; Idrissi Ammari, M.A. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* **1981**, 1(1), 59–64.
 275. Graillot, B.; Berling, M.; Blachère-López, C.; Siegwart, M.; Besse, S.; López-Ferber, M. Progressive adaptation of a CpGV Isolate to codling moth populations resistant to CpGV-M. *Viruses* **2014**, 6(12), 5135–5144, doi:10.3390/v6125135.
 276. Zeddami, J.L.; Vasquez Soberon, R.M.; Vargas Ramos, Z.; Lagnaoui, A. 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). *Bol. San. Veg. Plagas* **2003**, 29, 659–667.
 277. Graillot, B.; Blachère-Lopez, C.; Besse, S.; Siegwart, M.; Lopez-Ferber, M.; Lopez, M.; Blachère-López, C.; López-Ferber, M. Importance of the host phenotype on the preservation of the genetic diversity in codling moth granulovirus. *Viruses* **2019**, 11(7), 621–632, doi:10.3390/v11070621.
 278. CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System #3600037. Disponible en ligne : <https://www.bio-rad.com/fr-fr/sku/3600037-cfx96-touch-deep-well-real-time-pcr-detection-system?ID=3600037> (accessed on Jul 15, 2020).
 279. Mariamé, B.; Kappler-Gratias, S.; Kappler, M.; Balor, S.; Gallardo, F.; Bystricky, K.; Jung, J.U. Real-time visualization and quantification of human cytomegalovirus replication in living cells using the ANCHOR DNA labeling technology. *J. Virol.* **2018**, 92(18), e00571-18, doi:10.1128/JVI.
 280. Brenni, P. Microscope électronique. Disponible en ligne : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/microscope-electronique/> (accessed on Apr 28, 2020).
 281. Erlandson, M.A.; Toprak, U.; Hegedus, D.D. Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. *J. Insect Physiol.* **2019**, 117, 103894, doi:10.1016/j.jinsphys.2019.103894.
 282. Possee, R.D.; Rorhmann, G.F. Baculovirus genome organization and evolution. In *The baculoviruses*; Miller L.K., Ed.; Plenum Press: New York, 1997; pp. 109–140.
 283. Summers, M.D. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Adv. Virus Res.* **2006**, 68, 3–73, doi:10.1016/S0065-3527(06)68001-9.
 284. Smith, G.E.; Summers, M.D.; Fraser, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **1983**, 3(12), 2156–2165, doi:10.1128/MCB.3.12.2156.
 285. Graham, T.G.W.; Wang, X.; Song, D.; Etson, C.M.; van Oijen, A.M.; Rudner, D.Z.; Loparo, J.J. ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev.* **2014**, 28(11), 1228–1238, doi:10.1101/gad.242206.114.

286. Sanchez, A.; Cattoni, D.I.; Walter, J.-C.; Rech, J.; Parmeggiani, A.; Nollmann, M.; Bouet, J.-Y. Stochastic self-assembly of ParB proteins builds the bacterial dna segregation apparatus. *Cell Syst.* **2015**, 1(2), 163–173, doi:10.1016/j.cels.2015.07.013.
287. Germier, T.; Kocanova, S.; Walther, N.; Bancaud, A.; Shaban, H.A.; Sellou, H.; Politi, A.Z.; Ellenberg, J.; Gallardo, F.; Bystricky, K. Real-time chromatin dynamics at the single gene level during transcription activation. *bioRxiv* **2017**, 113(7), 1383–1394, doi:10.1101/111179.
288. Saad, H.; Gallardo, F.; Dalvai, M.; Tanguy-le-Gac, N.; Lane, D.; Bystricky, K. DNA dynamics during early double-strand break processing revealed by non-intrusive imaging of living cells. *Plos Genet.* **2014**, 10(3), e1004187, doi:10.1371/journal.pgen.1004187.
289. Komatsu, T.; Quentin-Froignant, C.; Carlon-Andres, I.; Lagadec, F.; Rayne, F.; Ragues, J.; Kehlenbach, R.H.; Zhang, W.; Ehrhardt, A.; Bystricky, K.; *et al.* In vivo labelling of adenovirus DNA identifies chromatin Anchoring and biphasic genome replication . *J. Virol.* **2018**, 92(18), doi:10.1128/jvi.00795-18.
290. Kitts, P.A.; Possee, R.D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* **1993**, 14(5), 810—817.
291. Hajós, J.P.; Zuidema, D.; Kulcsár, P.; Heldens, J.G.M.; Závodszky, P.; Vlák, J.M. Recombination of baculovirus DNA following lipofection of insect larvae. *Arch. Virol.* **1998**, 143(10), 2045–2050, doi:10.1007/s007050050441.
292. Hilton, S.; Winstanley, D. Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J. Gen. Virol.* **2007**, 88(5), 1496–1504, doi:10.1099/vir.0.82760-0.
293. King, L.; Hitchman, R.; Possee, R. Recombinant Baculovirus Isolation. In *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*; Murhammer, D.W., Ed.; Humana Press: New York, 2016; pp. 77–93.
294. Okano, K.; Mikhailov, V.S.; Maeda, S. Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories. *J. Virol.* **1999**, 73(1), 110–9, doi: 10.1128/JVI.73.1.110-119.1999.
295. Vanarsdall, A.L.; Okano, K.; Rohrmann, G.F. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *J. Virol.* **2006**, 80(4), 1724–1733, doi:10.1128/jvi.80.4.1724-1733.2006.
296. New England Biolabs. *Overview of qPCR*. Disponible en ligne : 2016; <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/qpcr-and-rt-qpcr>
297. Pruvot, M. Diagnostic de *Trypanosoma evansi* : mise en place, standardisation et évaluation d'outils de PCR et d'Ac-ELISA : application à une étude préliminaire chez le bovin laitier en Thaïlande, Thèse de doctorat. École nationale vétérinaire de Toulouse, 2009, 108.
298. Issa, R.; Abdul, H.; Hashim, S.H.; Seradja, V.H.; Shaili, N. 'Aishah; Hassan, N.A.M. High resolution melting analysis for the differentiation of *Mycobacterium* species. *J. Med. Microbiol.* **2014**, 63(10), 1284–1287, doi:10.1099/jmm.0.072611-0.

299. Toubanaki, D.K.; Karagouni, E. Genotype-specific real-time PCR combined with high-resolution melting analysis for rapid identification of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Arch. Virol.* **2017**, 162(8), 2315–2328, doi:10.1007/s00705-017-3375-4.
300. Zhong, X.; Li, Q.; Yu, H.; Kong, L. Development and validation of single-nucleotide polymorphism markers in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using high-resolution melting analysis. *J. World Aquac. Soc.* **2013**, 44(3), 455–465, doi:10.1111/jwas.12044.
301. Ashrafi, R.; Bruneaux, M.; Sundberg, L.-R.; Pulkkinen, K.; Ketola, T. Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent intraspecific competition in a pathogenic bacterium. *Sci. Rep.* **2017**, 7(1), 980, doi:10.1038/s41598-017-01074-y.
302. Villinger, J.; Mbaya, M.K.; Ouso, D.; Kipanga, P.N.; Lutomiah, J.; Masiga, D.K. Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis. *Mol. Ecol. Resour.* **2017**, 17(3), 466–480, doi:10.1111/1755-0998.12584.
303. Fisher, C.; Meng, R.; Bizouarn, F.; Scott, R. *High Resolution Melt Parameter Considerations for Optimal Data Resolution*; Hercules (USA), 2010, 6.
304. Stoeckli, S.; Hirschi, M.; Spirig, C.; Calanca, P.; Rotach, M.W.; Samietz, J. Impact of climate change on voltinism and prospective diapause induction of a global pest insect - *Cydia pomonella* (L.). *PloS One* **2012**, 7(4), e35723, doi:10.1371/journal.pone.0035723.
305. Glen, D.M.; Clark, J. Death of *Cydia pomonella* larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus. *Entomol. Exp. Appl.* **1985**, 38(1), 93–96, doi:10.1111/j.1570-7458.1985.tb03503.x.
306. Ballard, J.; Ellis, D.J.; Payne, C.C. Uptake of granulovirus from the surface of apples and leaves by first instar larvae of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Olethreutidae). *Biocontrol Sci. Technol.* **2000**, 10(5), 617–625, doi:10.1080/095831500750016415.
307. Geier, P.W. The life history of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), in the Australian capital territory. *Aust. J. Zool.* **1963**, 11(3), 323–367, doi:10.1071/zo9630323.
308. Wearing, C.H. Distribution characteristics of eggs and neonate larvae of codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Int. J. Insect Sci.* **2016**, 8, 33–53, doi:10.4137/ijis.s38587.
309. Glen, D.M.; Payne, C.C. Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Ann. Appl. Biol.* **1984**, 104(1), 87–98, doi:10.1111/j.1744-7348.1984.tb05590.x.
310. Huber, J.; Dickler, E. Influence of the concentration on the efficacy of the granulosis virus in the field. In Proceedings of the Joint FAO/IAEA and IOBC/WPRS meeting; Dickler, Ed.; Berlin, 1978; pp. 75–77.
311. Witzgall, P.; Stelinski, L.; Gut, L.; Thomson, D. Codling Moth Management and Chemical Ecology. *Annu. Rev. Entomol.* **2008**, 53(1), 503–522, doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093323.

312. Subinprasert, S.; Svensson, B.W. Effects of predation on clutch size and egg dispersion in the codling moth *Laspeyresia pomonella*. *Ecol. Entomol.* **1988**, 13(1), 87–94, doi:10.1111/j.1365-2311.1988.tb00336.x.
313. Burgerjon, A. Recent experiences in the use of codling moth (*Cydia pomonella* L.) granulosis virus in Europe. In Proceedings of the Proceedings of the IV International Colloquium on Invertebrate Pathology; Samson, R.A., Vlak, J.M., Peters, D., Eds.; 1986; pp. 102–105.
314. Beas-Catena, A.; Sánchez-Mirón, A.; García-Camacho, F.; Contreras-Gómez, A.; Molina-Grima, E. Baculovirus biopesticides: an overview. *J. Anim. Plant Sci* **2014**, 24(2), 362–373.
315. Jehle, J.; Sauer, A.; Gueli Alletti, G.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K. Granulovirusresistenz beim Apfelwickler und neue resistenzbrechende Granulovirus-Isolate. *Öko-Obstbau* **2016**, 2, 16–18.
316. Sheppard, R.F.; Stairs, G.R. Dosage-mortality and time-mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Journal Invertebr. Pathol.* **1977**, 29(2), 216–221, doi:10.1016/0022-2011(77)90196-3.
317. Carrera, M. V.; Zeddani, J.L.; Pollet, A.; Lery, X.; Lopez-Ferber, M. Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. In Proceedings of the IOBC/WPRS Bull. 31; 2008; pp. 40–43.
318. Knight, A.L.; Basoalto, E.; Witzgall, P. Improving the performance of the granulosis virus of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by adding the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with sugar. *Environ. Entomol.* **2015**, 44(2), 252–259, doi:10.1093/ee/nvv008.
319. Ohkawa, T.; Volkman, L.E.; Welch, M.D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J. Cell Biol.* **2010**, 190(2), 187–195, doi:10.1083/jcb.201001162.
320. Volkman, L.E. Baculovirus Infectivity and the Actin Cytoskeleton. *Curr. Drug Targets* **2007**, 8(10), 1075–1083, doi:10.2174/138945007782151379.
321. Rohrmann, G.F.; Erlandson, M.A.; Theilmann, D.A. Genome sequence of an alphabaculovirus isolated from *Choristoneura murinana*. *Genome Announc.* **2014**, 2(1), doi:10.1128/genomea.01135-13.
322. Angelini, A.; Amargier P.; Vandamme, A.; Duthoit, J.L. Une virose à granules chez le lépidoptère *Argyroplote leucotreta*. *Cot. Fibres Trop.* **1965**, 20(2), 277–282.
323. Van Der Merwe, M.; Jukes, M.D.; Rabalski, L.; Knox, C.; Opoku-Debrah, J.K.; Moore, S.D.; Krejmer-Rabalska, M.; Szewczyk, B.; Hill, M.P. Genome analysis and genetic stability of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrLeGV-SA) after 15 years of commercial use as a biopesticide. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18(11), doi:10.3390/ijms18112327.
324. Jukes, M.; Rabalski, L.; Knox, C.; Szewczyk, B. Baculovirus synergy: mixed Alphabaculovirus and Betabaculovirus infections for the control of *Thaumatotibia leucotreta* in South Africa. In Proceedings of the 16th meeting of the IOBC-WPRS; Tbilisi (Georgia), 2017.
325. Moore, S.; Hill, M.; Knox, C.; Marsberg, T.; Jukes, M.; Szewczyk, B.; Chambers, C. Brevet : A nucleopolyhedrovirus (NPV), for use in controlling insect populations 2017.

326. Martire, D. *Cryptophlebia peltastica* (Meyrick, 1921). Disponible en ligne : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/458162 (accessed on Jul 15, 2020).
327. Martire, D. *Thaumatotibia leucotreta* (Meyrick, 1913). Disponible en ligne : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/713546 (accessed on Jul 15, 2020).
328. Lepore, L.S.; Roelvink, P.R.; Granados, R.R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* **1996**, 68(2), doi:10.1006/jipa.1996.0070.
329. Tanada, Y. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Pathol* **1959**, 1, 215–231.
330. Erez, Z.; Steinberger-Levy, I.; Shamir, M.; Doron, S.; Stokar-Avihail, A.; Peleg, Y.; Melamed, S.; Leavitt, A.; Savidor, A.; Albeck, S.; *et al.* Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* **2017**, 541(7638), 488–493, doi:10.1038/nature21049.

Structuration of baculoviral populations.

Importance of multiple infection.

Keywords: *Cydia pomonella*, biological control, baculovirus, CpGV, resistance, genetic diversity, multiple infection, genotypic identification, HRM, ANCHORTM

Abstract

The management of crop pests has always been an important issue. In modern agriculture, this management involves notably the use of insecticides increasingly respectful of environment and health. In the control of the apple pests *Cydia pomonella*, bioinsecticides based on the baculovirus CpGV have been used in Europe for almost 30 years. However, the massive use of a single viral genotype has led to the emergence and spread of resistant insects, compromising fruit productions. It has been shown that baculovirus diversity of genotypes persists in resistant insect populations even when insects have developed a specific resistance against some of these genotypes. The use of this diversity in biological control, especially to get each insect infected by several genotypes, represents a solution against insect resistance emergence.

The objective of this research is to provide sustainable resistance management by exploring the benefits of multiple infections and viral genetic diversity in agronomic uses. This work is divided into two parts, one deals with the development and the other with the use of exploration methods of multiples infections in field and laboratory conditions. Two tools allowing the monitoring of different CpGV genotypes at different scales have been developed. The first tool is the adaptation of the ANCHORTM technology to baculoviruses, which makes them autofluorescent and allows the monitoring of each genotype within a cell. The second tool is the use of differences in the melting temperature of specific fragments in their genomes (HRM), here the differential fragment of the *pe38* gene was used. This tool enables to quantify the frequency of genotypes CpGV-M and CpGV-R5 in infected insect and to analyze a large number of samples, in order to establish the prevalence of genotypes in a population. These tools have been used both in field and laboratory to assess the dynamics of multiple infections. The study of interactions between CpGV-M and CpGV-R5 highlighted the specific cooperation between the two genotypes. These works have led to improvement paths in commercial CpGV-based products and their application methods in particular the recommendation of increased CpGV doses during the 2nd and 3rd generations of insects.

Structuration des populations virales chez les baculovirus.

Importance de l'infection multiple.

Mots clefs : *Cydia pomonella*, lutte biologique, baculovirus, CpGV, résistance, diversité génétique, infection multiple, identification de génotypes, HRM, ANCHORTM

Résumé

La gestion des ravageurs des cultures a été de tout temps un enjeu d'importance. Dans l'agriculture moderne, cette gestion passe en particulier par l'utilisation d'insecticides de plus en plus respectueux de l'environnement et de la santé. Dans la lutte contre le ravageur du pommier *Cydia pomonella*, les bioinsecticides à base du baculovirus CpGV sont utilisés en Europe depuis presque 30 ans. Cependant, l'utilisation massive d'un seul génotype viral a conduit à l'apparition, et la dispersion, d'insectes résistants, compromettant les productions fruitières. Il a été montré que la diversité génétique des baculovirus persiste dans les populations d'insectes résistants, même les génotypes contre lesquels des résistances spécifiques ont été développées. L'utilisation de cette diversité en lutte biologique, en particulier l'obtention d'une infection multiple dans chaque insecte, représente une solution pour limiter l'apparition de résistance chez l'insecte.

L'objectif de ces travaux de recherche est de garantir une gestion durable des résistances, en explorant les avantages de la diversité génétique virale et des infections multiples pour une utilisation agronomique. Ce travail comporte deux parties, l'une portant sur le développement et l'autre sur l'utilisation de méthodes d'exploration des infections en conditions de terrain et de laboratoire. Deux outils permettant le suivi des génotypes de CpGV à différentes échelles ont été développés. Le premier outil est l'adaptation de la technologie ANCHORTM aux baculovirus, en les rendant autofluorescents, cette technique permet de suivre chaque génotype à l'intérieur d'une cellule. Le deuxième outil est l'utilisation des différences de température de fusion de fragments spécifiques de leurs génomes (HRM), ici le fragment différentiel du gène *pe38* a été utilisé. Cet outil permet de quantifier la fréquence des génotypes CpGV-M et CpGV-R5 dans un insecte infecté, et d'analyser un grand nombre d'échantillons, donc d'établir la prévalence de ces génotypes dans une population. Ces outils ont été mis en application sur le terrain et en laboratoire afin d'évaluer la dynamique des infections multiples. L'étude des interactions entre CpGV-M et CpGV-R5 a permis de mettre en évidence la coopération spécifique entre les deux génotypes. Ces travaux ont permis d'apporter quelques pistes d'amélioration pour les produits commerciaux à base de CpGV et leurs modes d'application en particulier de préconiser une augmentation des doses de CpGV pour contrôler les 2^{ème} et 3^{ème} générations d'insecte.