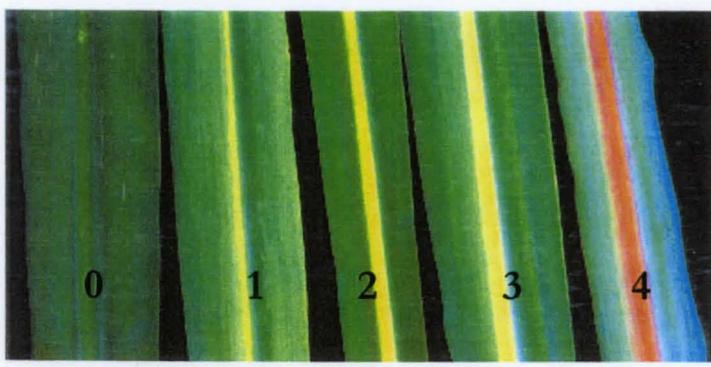


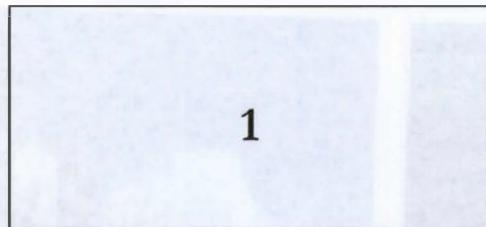
ABREVIATIONS

- ADN** : acide desoxiribonucléique
- ARN** : acide ribonucléique
- BMYV** : *Beet mild yellowing virus*
- BWYV** : *Beet western yellows virus*
- BYDV** : *Barley yellow dwarf virus*
- BYV** : *Beet yellow virus*
- CABYV** : *Cucurbit aphid-borne yellows virus*
- CMV** : *Cucumber mosaic virus*
- CYDV** : *Cereal yellow dwarf virus*
- CENICANA** : "Centro de Investigacion de la Caña de azúcar de Colombia"
- CERF** : Centre d'Essai, de Recherche et de Formation
- CIRAD** : Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
- COPERSUCAR** : "Cooperativa de productores de caña, açúcar e álcool do estado de São Paulo"
- CP** : protéine de capsid ("capsid protein")
- DAS-ELISA** : "double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay"
- ELISA** : "enzyme linked immunosorbent assay"
- F1** : première feuille déroulée avec ochréa visible au sommet de la tige
- GSA** : glandes salivaires accessoires
- GSP** : glandes salivaires principales
- HR** : réaction d'hypersensibilité
- ICTV** : "International Committee on the Taxonomy of Viruses"
- IE** : immuno-empreintes
- ISEM** : "immunosorbent electron microscopy"
- MLO** : organisme de type mycoplasme ("mycoplasma like organism")
- MP** : protéine de mouvement ("movement protein")
- MS** : Murashige et Skoog
- MSIRI** : "Mauritius Sugar Industry Research Institute"
- MSV** : *Maize streak virus*
- NJ** : "Neighbor-Joining"
- ORF** : cadre ouvert de lecture ("open reading frame")
- PEMV** : *Pea enation mosaic virus*
- PIB** : produit intérieur brut
- PCR** : réaction en chaîne de la polymérase ("polymerase chain reaction")
- PLATO** : "Partial Likelihoods Assessed Through Optimization"
- PLRV** : *Potato leafroll virus*
- PVY** : *Potato virus Y*
- RdRp** : ARN polymérase ARN-dépendante ("RNA dependant RNA polymerase")
- RFLP** : polymorphisme de taille des fragments de restriction "restriction fragment length polymorphism"
- RT** : protéine de translecture ("readthrough protein")
- RT-PCR** : transcription inverse de réaction en chaîne de la polymérase "reverse transcriptase polymerase chain reaction"
- RYMV** : *Rice yellow mottle virus*
- SASEX** : "South African Sugar Association Experiment Station"
- SbDV** : *Soybean dwarf virus*
- SCMV** : *Sugarcane mosaic virus*

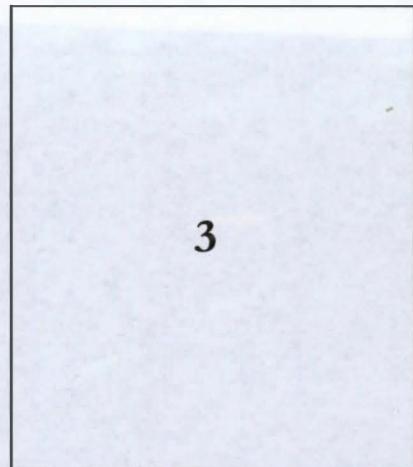
SCYP : Sugarcane yellows phytoplasma
SCYLV : *Sugarcane yellow leaf virus*
SqMV : *Squash mosaic virus*
TEV : *Tomato etch virus*
TLE : taille limite d'exclusion
TMV : *Tobacco mosaic virus*
UPGMA : "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean"
UTR : régions non codantes ("untranslated region")
VPg : protéine virale liée au génome ("genome-linked viral protein")
WMV : *Watermelon mosaic virus*
YLS : yellow leaf syndrome
ZYFV : *Zucchini yellow fleck virus*
ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus*

PLANCHE PHOTOGRAPHIQUE I

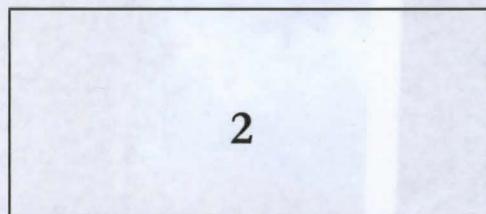




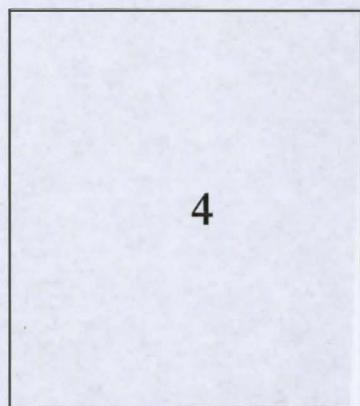
1



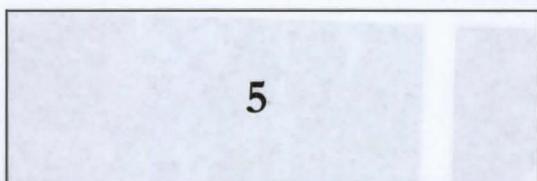
3



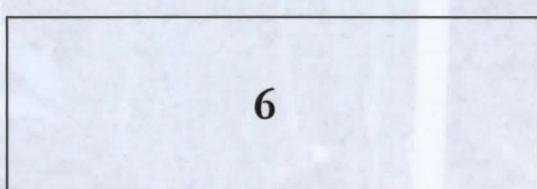
2



4



5



6

1 : Jaunissement de la face abaxiale de la nervure centrale des feuilles d'une touffe de canne à sucre

2 : Echelle de notation des symptômes du syndrome de la feuille jaune (de gauche à droite : notes 0 à 4)

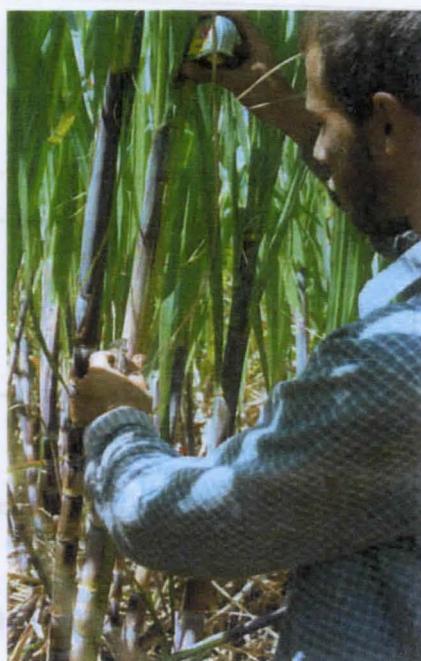
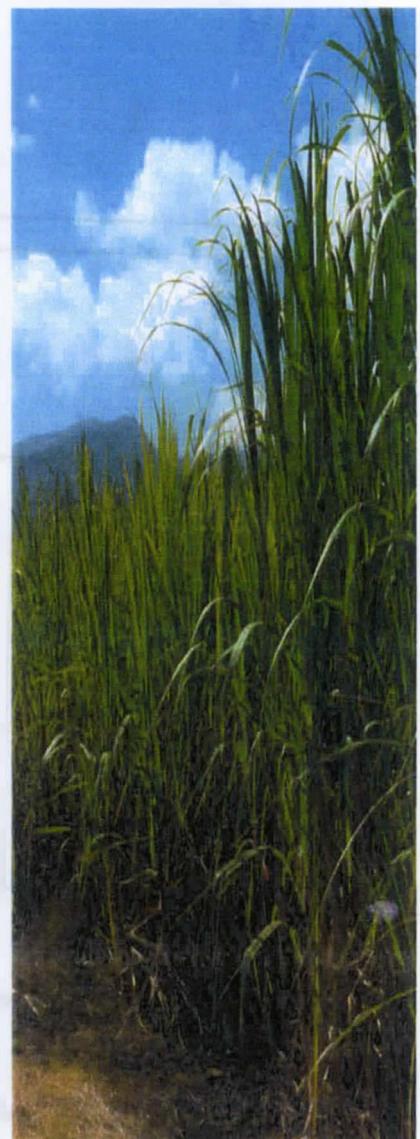
3 : Piège à eau pour la capture de pucerons dans un champ de canne à sucre

4 : Position de la feuille F1 (première feuille déroulée avec ochréa visible) sur une tige de canne à sucre (flèche rouge)

5 : Réalisation des immuno-empreintes sur membrane de nitrocellulose

6 : Empreintes de nervures de feuilles de canne à sucre, après révélation : à gauche, feuille infectée par le SCYLV (SCYLV +) et à droite, feuille saine (SCYLV-)

PLANCHE PHOTOGRAPHIQUE II





7



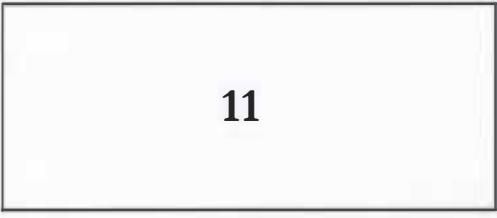
10



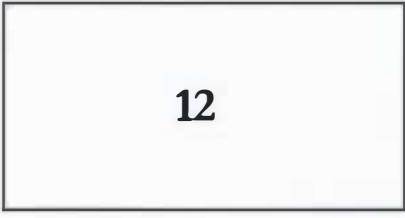
8



9



11



12

7 : Mise en place de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" (station du CIRAD à La Mare)

8 : Mesure du diamètre d'une tige grâce à un pied à coulisse sur le côté arrondi de la partie médiane de la tige

9 : Mesure de la taille d'une tige (distance entre le sol et l'ochréa de la feuille F1) à l'aide d'un ruban gradué

10 : Comparaison de deux parcelles de canne à sucre de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" : à gauche, cultivar R577 infecté par le SCYLV ; à droite, cultivar R577 indemne de SCYLV

11 : Essai "dynamique du SCYLV dans la plante " (sans destruction des plantes) en serre étanche aux insectes après 10 mois de croissance

12 : Vitroplants du cultivar R575 en cours de sevrage en serre étanche aux insectes (pour la mise en place de l'essai "transmission au champ")

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	10
1. LE LIEU : L'ÎLE DE LA RÉUNION	10
1.1. <i>Géographie</i>	10
1.2. <i>Climat</i>	10
1.3. <i>Sols</i>	11
1.4. <i>Végétation</i>	11
1.5. <i>Population</i>	11
1.6. <i>Indicateurs économiques</i>	12
2. LA PLANTE HÔTE : LA CANNE À SUCRE	12
2.1. <i>Taxonomie</i>	12
2.1.1. Les espèces non-sucrières	12
2.1.2. Les espèces sucrières	13
2.2. <i>Description botanique et physiologique</i>	13
2.2.1. La tige	13
2.2.2. Les feuilles	13
2.2.3. Les racines	13
2.2.4. L'inflorescence	14
2.3. <i>Cycle végétatif</i>	14
2.3.1. La canne vierge	14
2.3.2. Les repousses	15
2.4. <i>Répartition géographique</i>	15
2.5. <i>Importance économique</i>	15
3. LA MALADIE : LE SYNDROME DE LA FEUILLE JAUNE	16
3.1. <i>Distribution géographique et importance de la maladie</i>	16
3.2. <i>Symptomatologie</i>	17
3.3. <i>Agent(s) causal(s)</i>	17
3.3.1. Un virus	17
3.3.2. Des phytoplasmes	18
3.4. <i>Méthodes de détection</i>	18
3.4.1. Détection du SCYLV	18
3.4.2. Détection du SCYP	19
3.5. <i>Dissémination</i>	19
3.5.1. Dissémination du SCYLV	19
3.5.2. Dissémination du SCYP	19
3.6. <i>Méthodes de lutte</i>	19
4. ORIENTATION DES RECHERCHES	20
II. CHAPITRE 1 : IMPACT DU SCYLV SUR LA PLANTE HÔTE	22
1. INTRODUCTION	22
2. LES LUTEOVIRIDAE ET LEUR IMPACT SUR LE RENDEMENT	23
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
3.1. <i>Matériel</i>	25
3.2. <i>Méthodes</i>	26
3.2.1. Dispositif expérimental	26
3.2.2. Détection du SCYLV par immuno-empreintes (IE)	26
3.2.3. Symptomatologie	27
3.2.4. Nombre de tiges par touffe de canne à sucre	27
3.2.5. Hauteur et diamètre des tiges	27

3.2.6. Poids des tiges	27
3.2.7. Richesse en sucres	28
3.2.8. Analyses statistiques	28
3.2.9. Co-infection SCMV/SCYLV	28
4. RÉSULTATS	29
4.1. <i>Prospection</i>	29
4.2. <i>Pourcentage de germination et état sanitaire</i>	29
4.3. <i>Rendement</i>	29
4.4. <i>Symptomatologie</i>	30
4.5. <i>Co-infection SCMV/SCYLV</i>	30
5. DISCUSSION ET CONCLUSION	30
III. CHAPITRE 2 : DYNAMIQUE VIRALE	36
1. INTRODUCTION	36
2. DYNAMIQUE DES VIRUS DANS LES PLANTES	36
2.1. <i>Mouvement courte distance</i>	37
2.2. <i>Mouvement longue distance</i>	38
2.3. <i>Résistance d'une plante au mouvement des particules virales</i>	38
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
3.1. <i>Matériel</i>	38
3.2. <i>Méthodes</i>	39
3.2.1. Culture des plantes en serre	39
3.2.2. Détection du SCYLV	39
3.2.3. Détection du SCYLV par RT-PCR	40
3.2.4. Analyse statistique	41
4. RÉSULTATS	41
4.1. <i>Suivi des taux d'infection de trois cultivars de canne à sucre au champ</i>	41
4.2. <i>Dynamique virale au cours de la croissance de la canne à sucre</i>	41
4.2.1. Etude de la dynamique virale avec destruction des plantes aux dates de prélèvement	41
4.2.2. Etude de la dynamique virale sans destruction des plantes aux dates de prélèvement	42
5. DISCUSSION ET CONCLUSION	42
IV. CHAPITRE 3 : TRANSMISSION PAR LES INSECTES VECTEURS	45
1. INTRODUCTION	45
2. TRANSMISSION DES VIRUS PAR INSECTES VECTEURS	45
2.1. <i>Cas des phytoparvirus</i>	45
2.2. <i>Cas des Luteoviridae</i>	47
2.3. <i>Epidémiologie des Luteoviridae</i>	48
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
3.1. <i>Matériel</i>	49
3.2. <i>Méthodes</i>	49
3.2.1. Culture de méristèmes	49
3.2.2. Sevrage des vitroplants	49
3.2.3. Détection du SCYLV dans les vitroplants	49
3.2.4. Dispositif expérimental	49
3.2.5. Piégeage des insectes vecteurs	50
3.2.6. Extraction de l'ARN des pucerons	50
3.2.7. RT-PCR sur puceron	50
3.2.8. Visualisation de l'ADN	50
4. RÉSULTATS	51

4.1. <i>Essai transmission au champ</i>	51
4.2. <i>Détection de SCYLV dans des pucerons</i>	51
5. DISCUSSION ET CONCLUSION	51
V. CHAPITRE 4: DIVERSITE GENETIQUE DU SCYLV	54
1. INTRODUCTION	54
2. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES <i>LUTEOVIRIDAE</i>	54
3. LA CONSTRUCTION D'ARBRES PHYLOGÉNÉTIQUES À PARTIR DE DONNÉES MOLÉCULAIRES.....	58
3.1. <i>Méthodes fondées sur les distances</i>	58
3.1.1. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).....	59
3.1.2. NJ (Neighbor-Joining)	59
3.1.3. Méthodes dérivées des méthodes basées sur les distances	59
3.1.4. Les corrections des distances entre séquences de nucléotides.....	59
3.2. <i>Méthodes fondées sur les caractères</i>	60
3.2.1. Méthode de Parcimonie	60
3.2.2. Méthode de Maximum de vraisemblance.....	60
3.3. <i>Fiabilité des arbres phylogénétiques</i>	60
3.3.1. Le bootstrap.....	60
3.3.2. Permutation.....	61
3.4. <i>Enracinement d'un arbre</i>	61
3.5. <i>Conclusion</i>	61
4. MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
4.1. <i>Matériel</i>	62
4.2. <i>Méthodes</i>	62
4.2.1. Extraction d'ARN	62
4.2.2. RT-PCR	62
4.2.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse	62
4.2.4. Clonage et séquençage.....	63
4.2.5. Analyse phylogénétique	63
5. RÉSULTATS.....	63
5.1. <i>Amplifications partielles du génome de divers isolats de SCYLV</i>	63
5.2. <i>Localisation des mutations</i>	64
5.3. <i>Diversité des séquences nucléotidiques</i>	64
5.4. <i>Diversité des séquences protéiques</i>	65
5.5. <i>Variabilité de l'ensemble du génome</i>	66
6. DISCUSSION ET CONCLUSION	67
VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	70
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
ANNEXES	83
LISTE DES PUBLICATIONS.....	87
ABSTRACT	88

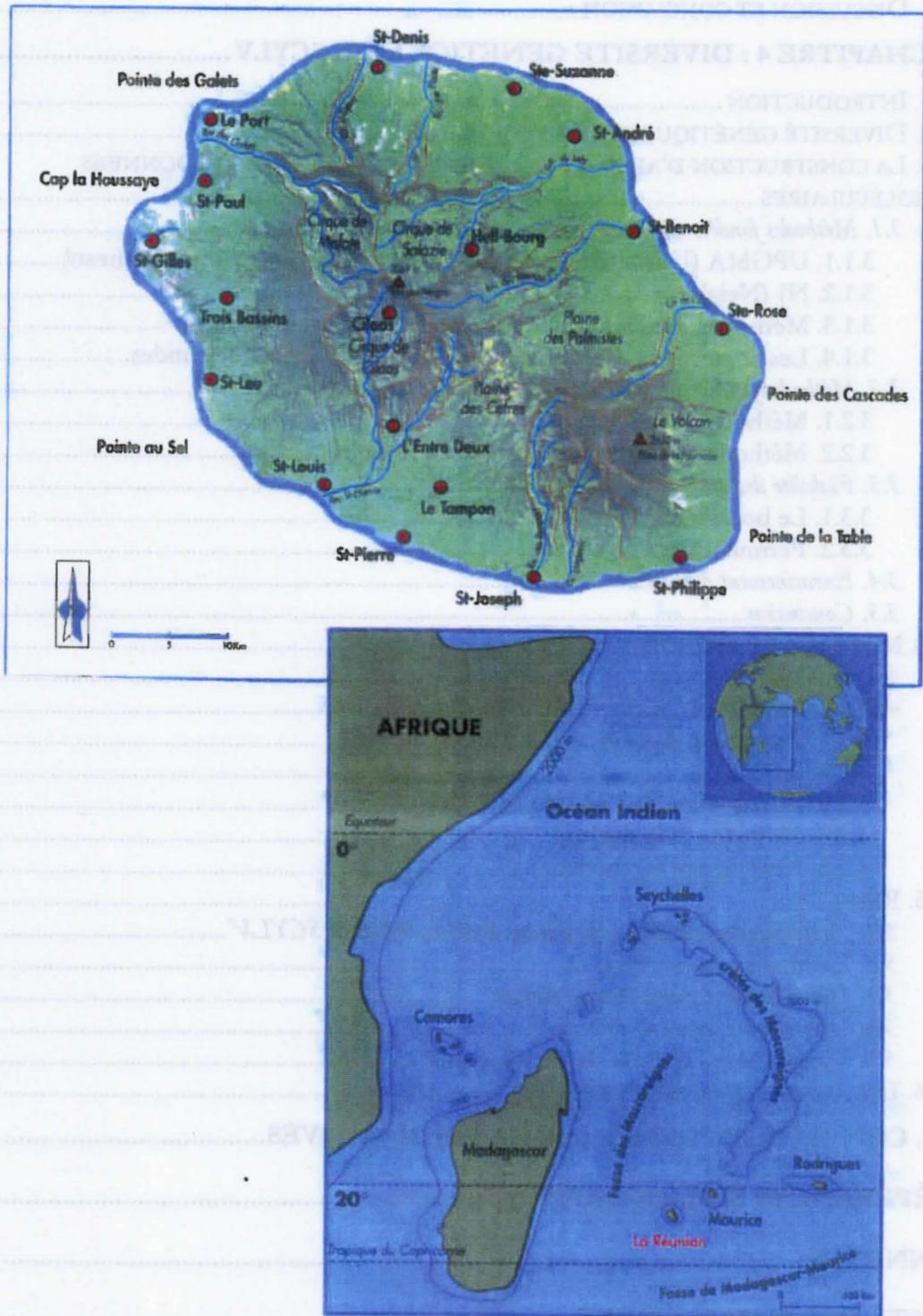


Figure 1 : Carte et situation géographique de l'île de La Réunion

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Le lieu : l'île de La Réunion

Le lieu d'investigation de ces travaux de thèse était l'île de La Réunion : département français d'outre-mer, localisé dans l'océan Indien au large de Madagascar (Figure 1).

1.1. *Géographie*

Situé dans l'hémisphère Sud, à près de 9200 km de Paris, l'île de La Réunion fait partie de l'archipel des Mascareignes (avec les îles Maurice et Rodrigues). Elle émerge dans la partie sud-ouest de l'océan Indien par 55°29' de longitude Est et 21°5' de latitude Sud. Sa superficie est de 2512 km² pour 207 km de côte (Bertile, 1987). C'est une île d'origine volcanique constituée de deux massifs accolés :

- le piton de la Fournaise, qui est un volcan en activité culminant à 2631 m d'altitude. Il est entouré d'une longue falaise en fer à cheval qui s'ouvre sur la mer,
- le piton des Neiges, haut de 3069 m, qui est un massif plus ancien profondément éventré par trois excavations résultant de l'effondrement et de l'érosion du cratère initial : les cirques de Cilaos, de Mafate et de Salazie.

Les deux pitons sont séparés par deux hautes plaines : la plaine des Cafres (1600 m) et la plaine des Palmistes (964 m). Les pentes générales sont faibles au sommet de l'île, s'accentuent aux altitudes moyennes (15 à 20%) et s'affaiblissent à nouveau vers les côtes. Le relief de l'île est donc très tourmenté : plus de 70% de sa superficie est située à une altitude supérieure à 800 m.

1.2. *Climat*

La Réunion bénéficie d'un climat tropical. Celui-ci dépend essentiellement de l'anticyclone semi-permanent de l'océan Indien qui se situe au sud-est de l'île et qui détermine ainsi une saison chaude et humide de novembre à avril, et une saison fraîche de mai à octobre (Bertile, 1987).

L'île est ainsi soumise à un fort courant d'alizés qui déterminent trois régions : 1/ la région au vent au sud-est, 2/ les régions intermédiaires au nord et au sud, et 3/ la région sous le vent qui ne reçoit pas les alizés à l'ouest. L'île est régulièrement dans la trajectoire de cyclones dévastateurs qui naissent entre les 5^e et 15^e parallèles Sud pour suivre grossièrement une trajectoire parabolique vers le sud-ouest.

La température est 1/ tropicale jusqu'à 500 m (avec une moyenne annuelle supérieure à 22°C), 2/ tropicale atténuée (16 à 21°C) dans une zone intermédiaire comprise entre 500 et 1200 m, et 3/ tempérée (inférieure à 15°C) avec parfois du givre et du gel en hiver dans les zones d'altitude au-dessus de 1200 m. Les mois les plus chauds sont ceux de janvier à mars, et les plus froids sont juillet et août. Cette douceur de climat par rapport à sa position géographique s'explique par : 1/ la présence de l'océan qui a un effet tampon, 2/ l'influence des alizés qui soufflent la plus grande partie de l'année, et 3/ l'importance du relief et de l'altitude qui crée une opposition climatique entre le littoral et les Hauts d'une part, et entre le versant au vent et le versant sous le vent d'autre part.

Le régime des pluies varie énormément entre la façade est et la façade ouest, à cause des alizés qui amènent l'humidité de la mer par le sud-est, et à cause du passage de cyclones qui provoquent des pluies torrentielles. La pluviométrie moyenne annuelle varie de 1 à 9 m. L'île détient des records mondiaux des hauteurs de pluie avec plus de 6000 mm en 15 jours (Bertile, 1987).

1.3. Sols

D'origine volcanique à dominante basaltique, les sols de La Réunion ont subi une pédogenèse intense du fait du climat tropical (Bertile, 1987). Ils présentent des pH neutres à acides et sont généralement d'épaisseur réduite. Ce sont principalement des andosols (80% des surfaces cultivables) qui se sont formés à partir des matériaux volcaniques originels. Ces sols restent humides tout au long de l'année de part leur grand pouvoir de rétention en eau. Il existe aussi des sols ferralitiques présents dans les massifs les plus anciens de l'île, des sols bruns qui se sont formés à basse altitude sur la côte sous le vent, et des vertisols, riches en montmorillonite, qui sont présents entre 0 et 150 m d'altitude sur la côte ouest.

1.4. Végétation

La végétation de La Réunion est très variée à l'image du relief et du climat. Les extrêmes sont, d'une part la savane semi-aride du littoral ouest et d'autre part, la lande éricoïde à plus de 1800 m d'altitude (Bertile, 1987). L'activité humaine a profondément bouleversé la végétation naturelle, principalement avec la ceinture sucrière qui s'étend jusqu'à 600, voire 1000 m d'altitude.

1.5. Population

Île vierge au moment de sa découverte en 1507, La Réunion comptait en 1999, 715 900 habitants dont plus de 40% ont moins de 20 ans (Anonyme, 2000). Le taux de natalité de 1,9% et l'indice de fécondité de 2,28 assurent sans problème le renouvellement des générations. Il y a eu 3832 décès en 1999, chiffre très faible qui peut expliquer la jeunesse de la population. L'espérance de vie est estimée à 78,6 ans pour les femmes et 70,4 ans pour les hommes.

La population affiche une augmentation annuelle depuis 1990 de 1,9% qui comprend le mouvement naturel et l'excédent migratoire (Anonyme, 2000). Le mouvement naturel, représentant la différence entre la natalité et la mortalité, correspond à 85% de l'accroissement, tandis que l'excédent migratoire constitue le solde. Dans l'hypothèse où ces chiffres se maintiendraient, La Réunion verrait sa population atteindre 821 000 habitants en 2010.

La densité de population s'élève à 282 habitants au km². L'île est principalement habitée sur sa frange littorale dans les principales villes que sont Saint-Denis (122 000 habitants et chef-lieu de La Réunion), Saint-Paul (72 000 habitants), Saint-Pierre (59 500 habitants), Le Tampon (48 500 habitants) et Saint-Louis (38 000 habitants).

La population est multiraciale : on distingue des métis de toutes origines (les "créoles"), des métropolitains (les "zoreils"), des noirs (les "cafres"), des asiatiques (les "chinois"), des indiens tamouls (les "malabars") ou des indiens musulmans (les "zarabes").

Les religions sont aussi très diversifiées pour une aussi petite surface : on distingue le christianisme, l'hindouisme, l'islamisme et le bouddhisme (Bertile, 1987).

La langue officielle est le français mais les gens parlent surtout le créole entre eux. De nombreuses autres langues sont parlées tel que le chinois, le malgache, le comorien...



Figure 2 : Aspect général d'une touffe de canne à sucre

1.6. Indicateurs économiques

Le PIB/habitant est de 57 431 FF (contre 127 629 FF en France métropolitaine). L'île importe plus qu'elle n'exporte. Les importations se chiffrent à 15,8 milliards de FF et les exportations à 1,3 milliards de FF. Les produits importés sont principalement ceux des industries alimentaires et des biens d'équipement (Anonyme, 2000).

La production agricole réunionnaise se partage en trois pôles économiques : la canne à sucre et autres plantes industrielles (30% de la production totale), les fruits et légumes (37%), les viandes et les produits d'élevage (33%). La canne à sucre a donc toujours un rôle socio-économique majeur sur l'île malgré une perte d'importance relative ces dernières années (Anonyme, 1999). En effet, à la fin des années 80, il y avait environ 30 000 ha de canne à sucre (soit plus de 2 200 000 tonnes livrées chaque année aux usines) et en 2000, il restait environ 25 000 ha de canne à sucre (soit environ 1 800 000 tonnes de canne à sucre livrées chaque année aux usines).

Concernant l'industrie, le secteur de la production sucrière occupe toujours une place de première importance, englobant à lui seul 12,5% du chiffre d'affaire industriel global (qui s'élève à 8,6 milliards de FF). L'île a accueilli 400 000 touristes en 1999, générant une recette totale de 1,8 milliards de FF (20,2% du chiffre d'affaire industriel global).

2. La plante hôte : la canne à sucre

2.1. Taxonomie

La canne à sucre est une monocotylédone de la famille des *Poaceae*, de la tribu des *Andropogoneae* et du genre *Saccharum* (Daniels et Roach, 1987). Les premières descriptions de canne à sucre ont été retrouvées dans la mythologie indienne, bien qu'il semble que son aire d'origine soit la Nouvelle-Guinée. Le mot "saccharum" vient du mot issu du sanskrit "sarkara" qui signifie sucre. Cette plante présente une grande variabilité intraspécifique du nombre de chromosomes ($2n = 40$ à 128) et, de ce fait, l'origine génétique de la canne à sucre est assez controversée. On admet, cependant, que le genre *Saccharum* est composé de six espèces parmi lesquelles on distingue deux catégories (Fauconnier et Bassereau, 1970 ; Irvine, 1978) : tout d'abord, les espèces non-sucrées, qui sont dépourvues de sucres et qui constituent les espèces dites "sauvages", puis les espèces sucrières, riches en sucres, domestiquées et exploitées par l'homme.

2.1.1. Les espèces non-sucrées

- *Saccharum spontaneum* ($2n = 40$ à 128). Pauvre en sucre, cette espèce est très utilisée en amélioration variétale étant donné sa bonne résistance aux maladies. Elle possède une étendue géographique très vaste qui s'étale du Japon jusqu'à l'Afrique de l'Est en passant par l'Asie du Sud-Est, le continent indien, le Moyen-Orient et le bassin méditerranéen (Brandes *et al.*, 1939).
- *Saccharum robustum* ($2n = 60$ à 80). On pense que cette espèce serait un hybride naturel entre plusieurs espèces de *Saccharum*. Elle serait originaire de la Papouasie-Nouvelle Guinée et des îles de Mélanésie, elle est restée endémique à cette région et son habitat naturel se situe sur les berges des rivières (Daniels et Roach, 1987).
- *Saccharum edule* ($2n = 60$ à 80). Cette espèce comprend un petit groupe de clones, circonscrits à la Nouvelle-Guinée et aux îles voisines. Elle est cultivée pour ses inflorescences comestibles.

Beaucoup d'auteurs s'accordent à dire qu'elle ne représente pas une espèce à part entière, mais qu'elle serait plutôt une mutation de *S. robustum*.

2.1.2. Les espèces sucrières

- *Saccharum officinarum* ($2n = 80$), aussi appelée canne noble en raison de sa forte teneur en sucre ; son aire d'origine serait la Nouvelle-Guinée compte tenu du fait que l'on y rencontre le plus de diversité (Brandes *et al.*, 1939).
- *Saccharum barberi* ($2n = 81$ à 124), et *Saccharum sinense* ($2n = 111$ à 120). Originaires respectivement d'Inde et de Chine, très robustes, elles résulteraient d'un croisement entre *S. officinarum* et *S. spontaneum*. De nombreux clones sont résistants aux principales maladies de la canne à sucre (Daniels et Roach, 1987) mais leur utilisation en amélioration génétique est limitée à cause de la rareté de la floraison et de la faible fertilité.

2.2. Description botanique et physiologique

D'un point de vue botanique, la canne à sucre présente, comme la plupart des *Poaceae*, de grands épis de fleurs voyants, des fruits réduits à des petits caryopses et un port herbacé avec des tiges droites regroupées en touffe. La plante a un grand nombre de racines superficielles et de longues feuilles (Figure 2).

Du point de vue physiologique, la canne à sucre a un fonctionnement photosynthétique de type C4, particulièrement efficace pour la fixation du CO₂ (Alexander, 1973).

2.2.1. La tige

La tige de la canne à sucre peut atteindre 2 à 5 m de haut pour un diamètre variant de 2 à 6 cm (Van Dillewijn, 1960). Elle est formée d'une succession de nœuds et d'entre-nœuds d'environ 20 cm de longueur. Son écorce cireuse et épaisse est d'une couleur qui varie du jaune au violet, souvent caractéristique du cultivar, pouvant dépendre du lieu de plantation et de l'ensoleillement. La tige se ramifie au niveau des yeux souterrains. Une touffe de canne peut ainsi être composée de 10 à 15 tiges.

2.2.2. Les feuilles

Les feuilles sont ordinairement insérées de façon alterne sur les nœuds grâce à une gaine (Van Dillewijn, 1960). Elles forment ainsi deux rangs opposés et situés approximativement dans le même plan. Une feuille de canne est composée de deux parties inégales : le limbe (mesurant plus d'un mètre) et la gaine (environ 20 cm) séparés par une articulation comprenant l'ochréa, la ligule et les auricules.

2.2.3. Les racines

Lorsqu'une bouture est plantée, deux sortes de racines se développent. Tout d'abord les racines de bouture qui sont minces et ramifiées, puis les racines de tige plus épaisses, peu ramifiées et charnues qui vont prendre en charge l'alimentation de la nouvelle plante (Van Dillewijn, 1960). Lorsque les tiges grandissent, on distingue en général trois sortes de racines (Blackburn, 1994) : 1/ les racines superficielles qui représentent environ 90% du poids racinaire et qui absorbent l'humidité de surface, 2/ les racines de soutien ou de fixation qui assurent la

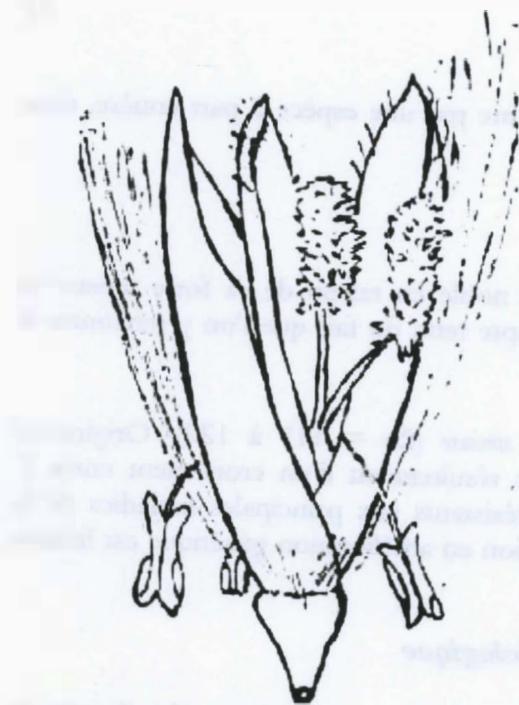


Figure 3 : Aspect d'une fleur de canne à sucre (Fauconnier et Bassereau, 1970)

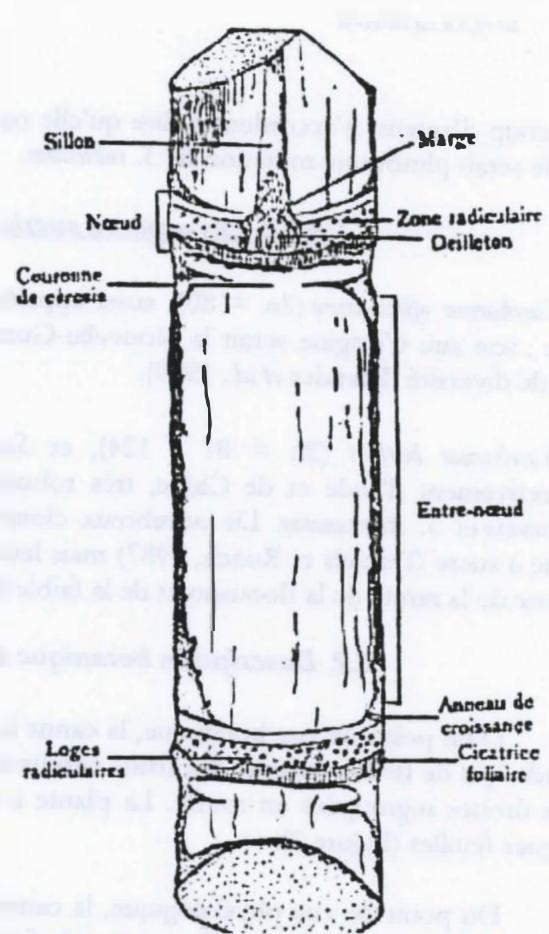


Figure 4 : Bouture de canne à sucre (Fauconnier et Bassereau, 1970)

stabilité de la plante, et enfin, 3/ les racines cordons, peu nombreuses, qui jouent un rôle dans la lutte contre la sécheresse.

2.2.4. L'inflorescence

L'inflorescence de la canne à sucre (appelée aigrette ou flèche) est un panicule rose argenté portant des fleurs hermaphrodites (Figure 3) donnant des caryopses de très petite taille (Van Dillewijn, 1960). La pollinisation est protogynie (les stigmates écartent les glumes plusieurs heures avant que les anthères apparaissent) et exclusivement anémophile. La floraison a lieu à partir du mois de novembre dans l'hémisphère Nord et à partir du mois de mai dans l'hémisphère Sud.

2.3. Cycle végétatif

Par voie sexuée, la canne à sucre produit de petits caryopses qui sont utilisés uniquement pour l'amélioration variétale car les agriculteurs utilisent la reproduction asexuée. Ces derniers effectuent la plantation avec des morceaux de tiges (les boutures : figure 4) comprenant au minimum deux nœuds ou deux bourgeons (encore appelés yeux). La canne à sucre est une culture pluriannuelle dont le cycle total dure de 4 à 10 ans environ. Le premier cycle de récolte après la plantation est appelé canne vierge (ou canne plantée selon le pays). La récolte est effectuée quand les tiges arrivent à maturité. Les bourgeons souterrains redémarrent alors pour donner naissance à de nouvelles tiges : ce deuxième cycle est appelé première repousse et donnera naissance, après la récolte, à la deuxième repousse et ainsi de suite. Le processus reste le même jusqu'à ce que le rendement soit jugé insuffisant. On renouvelle alors la plantation en arrachant les vieilles souches de canne à sucre (appareil souterrain qui reste en place après la récolte) et en plantant de nouvelles boutures.

2.3.1. La canne vierge

C'est la canne qui a été plantée et qui n'a jamais été coupée. Elle correspond au premier cycle cultural qui dure 9 à 24 mois selon les régions et dont les principales étapes sont les suivantes (Fauconnier et Bassereau, 1970) :

- *La plantation* : les boutures sont placées au fond de sillons parallèles, puis elles sont recouvertes d'une légère couche de terre.
- *La levée* (environ 15 jours) : les bourgeons se développent et donnent naissance à des tiges primaires, tandis qu'au niveau des nœuds souterrains apparaissent des racines qui prennent en charge l'alimentation de la plante.
- *Le tallage* (de 3 à 4 mois) : des tiges secondaires se développent à partir des bourgeons souterrains des premiers nœuds des tiges primaires. Les bourgeons souterrains des tiges secondaires donnent naissance à des tiges tertiaires et ainsi de suite. De chaque tige, naissent des racines qui prennent le relais des racines de bouture. On obtient ainsi ce que l'on appelle une touffe de canne à sucre. Le tallage est terminé quand la canne plantée couvre totalement le sol. Les tiges peuvent alors commencer à croître.
- *La croissance* (de 5 à 10 mois) : le bourgeon végétatif terminal de chaque tige donne naissance à une succession d'entre-nœuds et de nœuds (chaque nœud portant un nouveau bourgeon). Lorsque la tige s'allonge, les feuilles implantées à chaque nœud croissent, se déplient puis se dessèchent, pour être remplacées successivement par des feuilles plus jeunes, situées plus haut sur

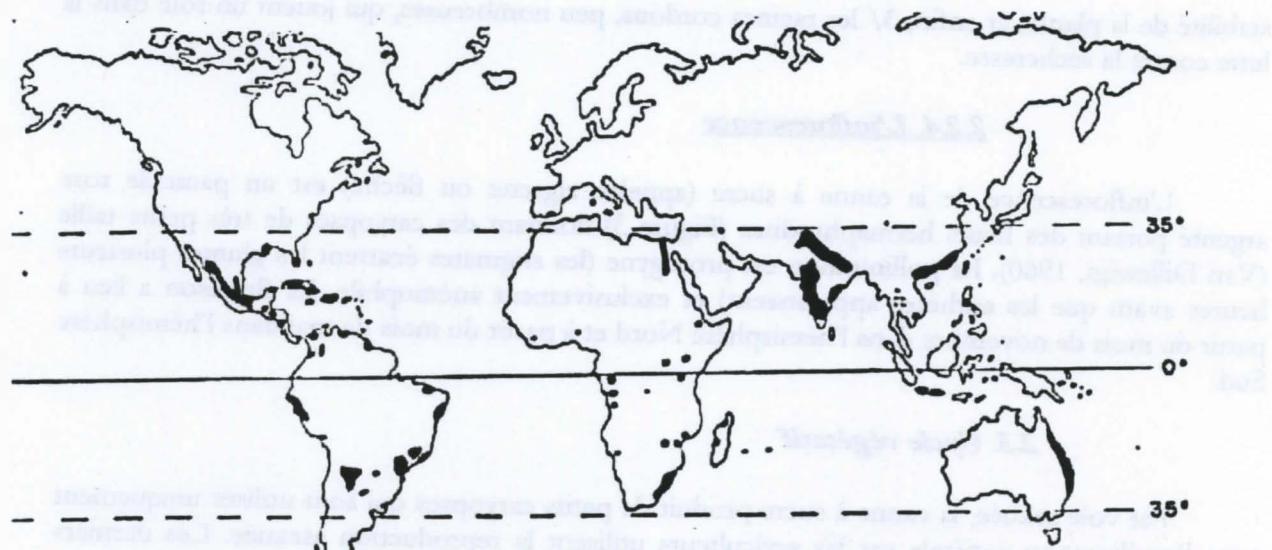
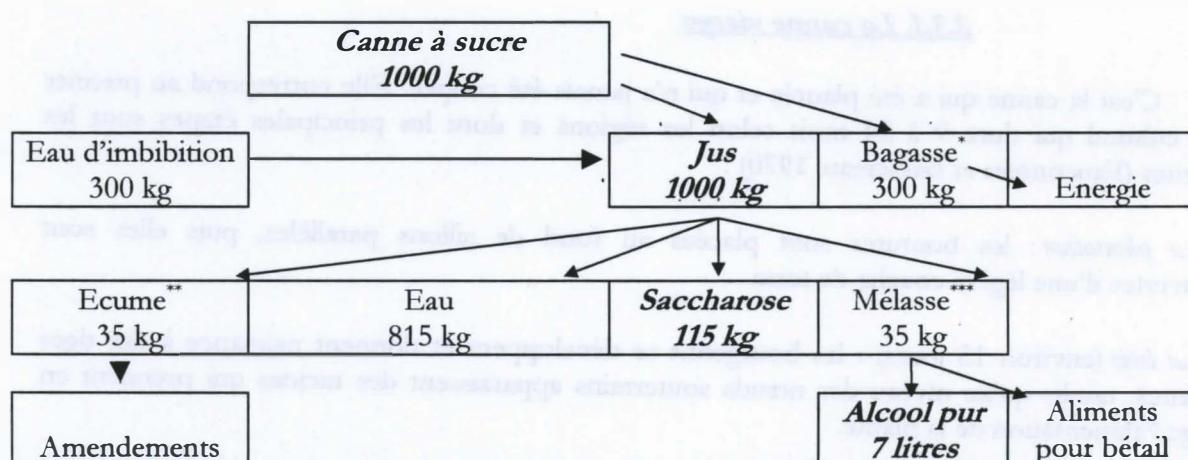


Figure 5 : Répartition de la production de canne à sucre dans le monde (Fauconnier et Bassereau, 1970)



* Bagasse : résidus solides et fibreux obtenus après broyage des tiges, ** Ecume : résidus de la filtration des jus après décantation, *** Mélasse : résidu liquide sucré dont il n'est plus possible d'extraire le saccharose par centrifugation

Figure 6 : Répartition des produits de la canne à sucre en poids (Anonyme, 1983)

La canne à sucre est un produit obtenu par le processus suivi : (cane 1000 kg) → (moulinage → jus) → (filtration → jus et eau) → (centrifugation → jus et sucrose) → (écume → eau) → (centrifugation → sucrose et mélasse) → (mélasse → alcool et engrangement) → (mélasse → engrangement)

la tige. Ce sont les dix premières feuilles déroulées qui assurent l'essentiel de l'activité photosynthétique.

- *Le flétrage et la floraison* : les hampes florales émergent au sommet de certaines tiges en mobilisant toute l'énergie de la plante dont la croissance sera fortement ralentie.
- *La maturation* (2 mois) : la plante constitue des réserves, d'abord élaborées sous forme de glucose, puis stockées sous forme de saccharose.
- *La coupe* : les tiges sont habituellement récoltées entre 10 et 16 mois après la plantation lors du premier cycle végétatif, et après 12 mois de croissance lors des cycles végétatifs suivants.

2.3.2. Les repousses

Après la récolte, il ne reste en terre que les souches de canne à sucre qui possèdent des bourgeons souterrains dormants. Ces derniers vont entrer en activité pour donner de nouvelles tiges. Le tallage est alors très intense, ce qui permet un renouvellement rapide du système racinaire.

2.4. Répartition géographique

La culture de la canne à sucre est limitée par le froid et l'altitude. Elle se situe entre 37° de latitude Nord et 30° de latitude Sud (Figure 5). On peut ainsi déterminer trois zones de culture (Fauconnier et Bassereau, 1970).

- Zone sub-tropicale : Espagne, Maroc, Louisiane, Floride, Afrique du Sud, Sud de l'Australie, Pakistan, Argentine... La canne à sucre y a une période de croissance limitée à 10 mois **maximum** et, de ce fait, les rendements en tonnes de canne à sucre sont assez faibles mais souvent compensés par une bonne teneur en sucres.
- Zone tropicale : Inde, Brésil, Mexique, Guatemala, Thaïlande, Philippines, Hawaii, Nord de l'Australie, Cuba, Zimbabwe, Maurice, Réunion... Les rendements y sont assez élevés étant donné les durées de croissance accrues.
- Zone équatoriale : Java, Colombie, Kenya, Ethiopie... Les rendements y sont très élevés car les pluies sont abondantes et bien réparties tout au long de l'année.

2.5. Importance économique

La canne à sucre constitue l'une des plus importantes cultures des régions tropicales et subtropicales. Elle est cultivée principalement pour ses tiges dont on extrait le saccharose (10 à 18%). On la cultive aussi pour la production d'alcool et de fourrage et quelques sous-produits de sa transformation sont utilisés comme source d'énergie dans certains pays (Figure 6).

En 2000, 125 millions de tonnes de saccharose ont été produites dans le monde dont 88 millions provenaient de la canne à sucre, soit plus de 70% (FAO, 2001). La canne à sucre est cultivée sur 19 millions d'hectares dans 82 pays (contre 8 millions d'hectares de betterave dans 48 pays) pour un rendement moyen de 64 tonnes de cannes/ha. A titre comparatif, le blé s'étend sur 224 millions d'hectares et produit en moyenne seulement 24 quintaux/ha. Si l'on considère le tonnage de sucre produit, la plante se classe au 7^e rang mondial. Une douzaine de pays se partage le marché de la canne à sucre mais le Brésil et l'Inde sont les deux producteurs les plus

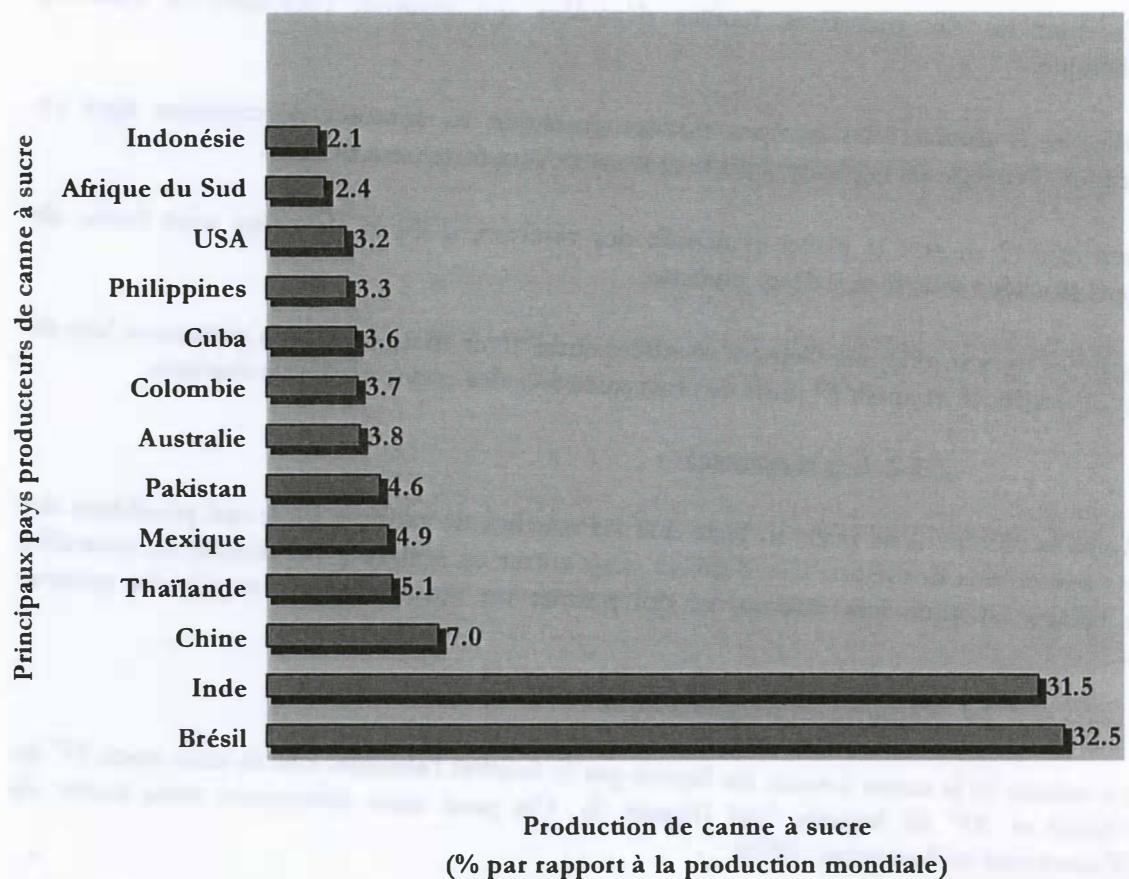


Figure 7 : Les principaux pays producteurs de canne à sucre dans le monde (FAO, 2001)

importants (Figure 7). Le Brésil représente cependant un cas assez particulier : la canne à sucre y est, utilisée non seulement pour produire du saccharose, mais aussi de l'alcool entrant dans la composition de carburant pour les automobiles. L'objectif du Programme National pour l'Alcool ou "PROALCOOL", créé en 1975, était d'utiliser l'éthanol comme combustible en remplacement de l'essence, mais également d'augmenter la production d'éthanol en vue d'une utilisation industrielle. En 10 ans de fonctionnement du programme, quelques 6,5 milliards de dollars ont été investis dans la production de 50 milliards de litres, 500 000 emplois environ ont été créés, 2,5 millions de véhicules ont roulé avec de l'éthanol pur et de l'essence de stations-service dont le mélange contient 20% d'éthanol. Le Brésil dispose aujourd'hui d'une technologie et d'équipements capables de maintenir une production annuelle de 16 milliards de litres et d'exporter cette technologie et ces équipements avec les services afférents (QUID, 2001).

A La Réunion, la canne à sucre est la principale culture de l'île où elle occupe un peu plus de 25 000 hectares. La production avoisine 1 700 000 tonnes de canne à sucre ce qui représente environ 180 000 tonnes de sucre et 126 000 hl d'alcool pur (Anonyme, 1989).

Cette culture a donc une importance économique considérable dans les régions chaudes, mais les champs de canne à sucre sont très sensibles aux maladies pour diverses raisons : 1/ l'utilisation de boutures lors des plantations qui facilite la dispersion des agents pathogènes, 2/ la monoculture de canne à sucre sur de grandes surfaces qui favorise le développement d'épidémies et 3/ l'aspect pluriannuel de cette culture (4 à 10 ans) qui complique les travaux de sélection variétale (Chatenet *et al.*, 2001).

3. La maladie : le syndrome de la feuille jaune

3.1. Distribution géographique et importance de la maladie

Des jaunissements foliaires particuliers sur canne à sucre ont été signalés à Hawaii en 1988 (Schenck, 1990 ; Schenck, 2001). Au début des années 1990, la société COPERSUCAR ("Cooperativa de productores de caña, açúcar e álcool do estado de São Paulo", Brésil) a constaté d'importantes chutes de rendement pour leur principal cultivar SP71-6163 qui présentait des jaunissements foliaires précoces. Ce clone était cultivé pour son taux de sucre et son tonnage élevés et les pertes ont été chiffrées entre 40 et 60% en fonction des régions (Burnquist et Vega, 1996 ; Vega *et al.*, 1997). Les symptômes décrits étaient identiques à ceux du Yellow wilt découvert en 1962 par Claude Ricaud en Tanzanie (Ricaud, 1968). Ce dernier avait noté une baisse de rendement d'environ 10% pour des cannes à sucre présentant des symptômes similaires et, n'ayant pas trouvé d'agent causal pour ces anomalies, il avait supposé qu'il s'agissait d'un problème agronomique.

Aujourd'hui, la maladie est appelée le syndrome de la feuille jaune (Yellow leaf syndrome ou YLS en anglais). Des enquêtes sur la présence et la distribution de la maladie ont été réalisées dans la plupart des grands pays producteurs et ce, avec beaucoup de difficultés, car les plantes sont souvent asymptomatiques. Il a été constaté que la maladie était largement répandue dans le monde. En 2000, la maladie a été recensée dans une vingtaine de pays : Australie, Colombie, Salvador, Guadeloupe, Barbade, Martinique, Guatemala, Ile Maurice, Afrique du Sud, Swaziland, Malawie, Zimbabwe, Maroc, Ile de La Réunion, Etats-Unis : Hawaii, Floride, Louisiane... mais il est probable que ce nombre augmentera dans les années à venir (Lockhart et Cronjé, 2000).

Dans la plupart des cas, les chercheurs ont mis en évidence des différences variétales marquées : certains cultivars sont très sensibles à la maladie comme CP72-1210 en Floride et H65-7052 à Hawaii (Comstock *et al.*, 1998). Mais il existe également des cultivars qui paraissent résistants car aucun agent causal n'y a jamais été détecté alors qu'ils étaient cultivés à proximité

d'autres cultivars présentant de forts taux d'infection. C'est le cas de M1176/77 à Maurice (Moutia et Saumtally, 1999), ou encore CP57-603 et CP89-1509 en Floride (Comstock *et al.*, 1998).

D'après les équipes de Floride, les taux d'infection des cultivars de canne à sucre seraient différents en fonction des parents d'origine, et surtout du parent femelle utilisée lors du croisement. En effet, il semblerait que les clones qui présentent de faibles taux d'infection en virus aient des ancêtres communs (Comstock *et al.*, 1999).

De plus en plus de complexes sucriers évaluent l'impact économique de la maladie sur leurs principaux cultivars. Après le Brésil, la Colombie a aussi annoncé des pertes de rendement importants : l'équipe du CENICANA ("Centro de Investigacion de la Caña de azúcar de Colombia") a déterminé des pertes variant entre 16 à 33% pour les cultivars suivants : MZ82-11, CC84-75 et CC84-96 (Jorge Victoria, communication personnelle). Par ailleurs, en Louisiane, il a été montré que la maladie peut avoir des effets néfastes sur la production, même en l'absence de symptômes. Le cultivar LCP82-89 a subi des pertes de rendement en sucre de 6%, 11% et 14%, respectivement en vierge, première et seconde repousse (Grisham *et al.*, 2000).

3.2. Symptomatologie

Les symptômes de cette maladie consistent en des jaunissements plus ou moins prononcés de la nervure centrale à la face abaxiale des jeunes feuilles (Photo 1), tandis que le limbe reste le plus souvent vert. Les feuilles plus âgées, non sénescentes, ont tendance à retrouver leur couleur verte. Quand la maladie est dans sa phase aiguë, on note généralement une nécrose de la feuille dans sa partie distale et une décoloration progressive et symétrique du limbe en jaune. Sur certains cultivars, une coloration de la nervure et du limbe en rose foncé au lieu du jaune est aussi possible (Photo 2). Ces symptômes sont en général visibles tardivement, à l'approche de la maturité, sauf pour les cultivars les plus sensibles. Il est à noter que les stress environnementaux provoquent souvent l'apparition de ces jaunissements (Schenck *et al.*, 1997 ; Comstock *et al.*, 1998). Par ailleurs, ces symptômes ne sont pas spécifiques de la maladie. En effet, une déficience ou un excès en nutriments ou en sels minéraux (Borth *et al.*, 1994), une initiation florale, une attaque de foreurs, l'approche de la maturité (Matsuoka et Meneghin, 1999), l'entrée en saison froide ou un excès d'eau (Comstock *et al.*, 1994), provoquent également des jaunissements de feuilles.

3.3. Agent(s) causal(s)

3.3.1. Un virus

Un des agents causals du syndrome de la feuille jaune est un membre non classé de la famille des *Luteoviridae* qui a été nommé *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (Maia *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). C'est un virus à ARN simple brin, à un seul composant, de polarité positive et à symétrie icosaédrale. Son génome est composé de 5898 nucléotides avec une masse moléculaire d'environ 2×10^6 daltons (Moonan *et al.*, 2000). Les particules virales ont un diamètre de 24 à 28 nm et sont localisées dans les cellules compagnes des vaisseaux du phloème (Schenck *et al.*, 1997 ; Vega *et al.*, 1997). L'implication du SCYLV dans le syndrome de la feuille jaune est fortement probable depuis que Scagliusi et Lockhart (2000) ont réussi à transmettre le virus de plantes malades à des plantes saines et à reproduire les symptômes de la maladie.

3.3.2. Des phytoplasmes

Le SCYLV ne semble cependant pas être le seul organisme pathogène associé à la maladie. Au Natal, les chercheurs de la SASEX ("South African Sugar Association Experiment Station", Afrique du Sud) avaient noté la présence de jaunissements de nervures foliaires chez divers cultivars de canne à sucre sans y détecter de virus. En revanche, par microscopie électronique, ils ont montré l'existence de corps polymorphes sphériques et filamenteux de 50 à 880 nm de diamètre dans les vaisseaux du phloème. Ils en ont conclu à l'existence d'un autre agent pathogène associé au YLS. Celui-ci serait un phytoplasme apparenté au Western X et il a été nommé Sugarcane yellows phytoplasma ou SCYP (Cronjé *et al.*, 1998). Par la suite, il a été montré qu'au moins deux types différents de phytoplasmes existeraient en Afrique du Sud et ils ont été nommés SCYP I et SCYP II. Le type I serait apparenté au Western X et le type II au White leaf (Cronjé et Bailey, 1999). A Maurice, trois types de phytoplasmes seraient également associés au YLS (Aljanabi *et al.*, 2001) : le premier apparenté au sous-groupe IB (European aster yellows), le second apparenté au sous-groupe IIIA (Western X) et le troisième apparenté au sous-groupe IVA (Coconut lethal yellows) selon la classification de Lee *et al.* (1998).

Les phytoplasmes (ex-MLOs ou "Mycoplasma Like Organisms") sont des procaryotes sans paroi cellulaire, responsables de plus de 300 maladies de plantes dans le monde. Ils possèdent un petit génome de 600 à 1600 kb, un faible taux de guanine et de cytosine, et ont des exigences nutritionnelles rares (Liefting *et al.*, 1996 ; Namba *et al.*, 1993 ; Semal, 1989).

Les résultats concernant la détection de phytoplasmes par PCR chez la canne à sucre doivent cependant être considérés avec beaucoup de prudence car la méthode utilisée ne fait pas l'unanimité parmi les chercheurs. En particulier, les amorces choisies pour la PCR ne conduisent pas toujours au même résultat et/ou amplifient des organismes autres que des phytoplasmes en raison de leur nature non spécifique (Davis, 2000). Par ailleurs, il semble que l'on détecte dans les cannes à sucre le type de phytoplasme qui prédomine aussi sur d'autres plantes dans la région considérée (Cronjé et Jones, 2000). On peut donc se poser la question de savoir si le phytoplasme est réellement impliqué dans le YLS ou si sa présence est simplement fortuite. Une excellente corrélation entre la présence de symptômes et la présence de phytoplasmes a cependant été mise en évidence en Afrique du Sud (Cronjé *et al.*, 1998) et à Cuba (Peralta *et al.*, 2000). En revanche, alors que postulat de Koch (principe qui énonce les règles permettant d'établir une relation causale entre un microbe et une maladie) a été partiellement vérifié pour le SCYLV (Scagliusi et Lockhart, 2000), il ne l'a pas encore été pour les phytoplasmes associés au YLS.

3.4. Méthodes de détection

3.4.1. Détection du SCYLV

Différentes techniques de détection du SCYLV ont été mises au point. On dispose principalement de la microscopie électronique et notamment de l'ISEM ou immunosorbent electron microscopy (Burnquist et Vega 1996 ; Schenck *et al.*, 1997 ; Vega *et al.*, 1997), de techniques de biologie moléculaire comme la RT-PCR (Burnquist et Vega, 1996 ; Comstock *et al.*, 1998) et de méthodes sérologiques de type DAS-ELISA (Comstock *et al.*, 1998) ou les immuno-empreintes (IE) sur membrane de nitrocellulose (Burnquist et Vega, 1996 ; Schenck *et al.*, 1997). Ces méthodes immunologiques sont les plus souvent utilisées en diagnostic de routine, car elles sont relativement peu onéreuses et très fiables (Chatenet *et al.*, 2001; Delage, 1998 ; Rassaby *et al.*, 1999) .

3.4.2. Détection du SCYP

Outre l'utilisation de la microscopie électronique, le SCYP est détecté par PCR, avec une technique spéciale d'amplification par PCR nichée ou "nested PCR" (Aljanabi *et al.*, 2001 ; Cronjé *et al.*, 1998 ; Peralta *et al.*, 2000). Aucune technique sérologique n'est efficace à ce jour pour détecter le SCYP bien qu'il en existe pour d'autres phytoplasmes (Cronjé, communication orale).

3.5. Dissémination

3.5.1. Dissémination du SCYLV

Le SCYLV est principalement disséminé par la plantation de boutures infectées (Moutia et Saumtally, 1999), mais aussi par l'intermédiaire d'insectes vecteurs (Lockhart et Cronjé, 2000 ; Schenck et Lehrer, 2000). Les *Luteoviridae* sont transmis essentiellement par des pucerons selon le mode circulant persistant (Smith et Barker, 1999).

A Hawaii, la contamination de plantes saines par le SCYLV peut être extrêmement rapide en fonction de l'efficacité des insectes vecteurs (Schenck et Lehrer, 2000). En effet, des cannes à sucre d'un cultivar sensible au SCYLV ont été assainies et plantées au champ à proximité de cannes à sucre infectés par le SCYLV. Il y avait 46% de contamination 18 semaines après la plantation. En revanche, des cannes à sucre assainies du même cultivar n'ont pas été contaminées au bout de 12 mois quand elles ont été plantées dans un zone sans cannes à sucre. Une étude plus récente de la même équipe a montré que la vitesse de propagation du SCYLV, une fois installé au sein de la parcelle de canne à sucre, était relativement lente d'une plante à l'autre ; elle a été estimée à environ 2 à 5 m par an (Lehrer *et al.*, 2001a). De plus, des études de transmission menées avec plusieurs espèces de pucerons ont montré que *Melanaphis sacchari* était un vecteur très efficace pour transmettre la maladie à des cannes à sucre saines issues de culture de tissus, alors que *Rhopalosiphum maidis* et *R. rufiabdominalis* l'étaient peu. La transmission de la maladie par *Sipha flava* et *Hysteroneura setariae* n'a pas été possible (Schenck et Lehrer, 2000).

3.5.2. Dissémination du SCYP

Peu de données sont disponibles sur la dissémination du SCYP, mais l'on sait que les phytoplasmes sont véhiculés par les homoptères et principalement par les cicadelles (Semal, 1989). En règle générale la transmission de phytoplasmes est possible par greffe (mais cela est impossible sur les monocotylédones), elle est totalement exclue par les semences vraies mais se fait surtout par la plantation d'organes de propagation végétative contaminés (cas de la canne à sucre).

3.6. Méthodes de lutte

Les traitements traditionnels comme la thermothérapie sont inefficaces pour éliminer le SCYLV ou le SCYP dans des boutures contaminées (Chatenet *et al.*, 2001 ; Cronjé *et al.*, 1998 ; Moutia et Saumtally, 2001). L'élimination de phytoplasmes peut être réalisée en passant par la reproduction sexuée (graines) ou par l'utilisation d'antibiotiques (Semal, 1989). La canne à sucre infectée par le SCYLV peut être assainie grâce à la culture de tissus (Chatenet *et al.*, 2000 ; Parmessur et Dookun, 2000). En effet, la culture de cals issus de tissus de feuilles enroulées et la culture de méristèmes présentent des taux d'assainissement très importants (de 90 à 100%). Mais l'élimination du virus par culture de bourgeons est moins efficace (Chatenet *et al.*, 2001 ; Delage, 1998 ; Ripolles, 1997). Ces méthodes sont très utilisées en quarantaine pour éviter de propager la maladie d'un pays à un autre. En revanche, leur utilisation pour produire du matériel sain en pépinière est moins appropriée si la contamination de matériel sain est rapide au champ. A plus

long terme, la résistance variétale apparaît donc comme le moyen le plus efficace pour lutter contre la maladie.

4. Orientation des recherches

La filière canne à sucre représente un enjeu économique considérable dans le monde, notamment à l'île de La Réunion où elle constitue l'une des principales activités agricoles. Sa productivité est conditionnée par des résultats de recherche et de développement dans quatre domaines majeurs : 1/ la protection de la plante vis-à-vis des agents pathogènes et des ravageurs, 2/ l'amélioration variétale, 3/ les pratiques culturales (irrigation, fertilisation...), et 4/ la maîtrise des coûts de production (mécanisation, gestion...). Le sujet de thèse que nous proposons ici représente un effort de recherche concernant la défense des cultures.

A La Réunion, des symptômes de jaunissement précoce étaient signalés sur le cultivar S17 dès le début des années 1980 (Rassaby *et al.*, 1999). Cependant, ce n'est qu'en 1997 que des échantillons suspects ont été analysés au CIRAD à Montpellier pour rechercher la présence du SCYLV et à la SASEX pour rechercher celle du SCYP. Les tests ont été positifs dans les deux cas (Chatenet *et al.*, 2001 ; Cronjé *et al.*, 1998).

En 1998, une première enquête sur la distribution de la maladie à La Réunion a été réalisée en huit localités réparties sur toute l'île (Rassaby *et al.*, 1999). Trois cultivars ont été pris en compte : R570, R575 et R579. L'analyse de 2400 échantillons a permis de montrer que le SCYLV était largement distribué sur l'île et dans les trois cultivars étudiés. Une différence variétale a aussi été mise en évidence. C'est ainsi que R570 présentait des taux d'infection faibles en moyenne sauf exception (10 à 90%), R575 des taux d'infection toujours élevés ($> 90\%$) et R579 des taux d'infection plus ou moins intermédiaires (30 à 90%). Par ailleurs, des différences significatives entre les sites de prélèvement ont également été mises en évidence. Même si une part importante des échantillons porteurs du virus étaient asymptomatiques, la présence de symptômes apparaissait liée à celle du virus : plus les symptômes étaient sévères, plus le taux de contamination était élevé.

Lors de cette enquête, la présence et la répartition du phytoplasme ont également été recherchées, mais les résultats n'ont pas été validés. En effet, tous les tests de diagnostic n'ont pas pu être réalisés et les extraits d'ADN n'ont pas été analysés par RFLP après amplification par PCR. Ces tests devaient être effectués à la SASEX quelques mois plus tard, mais les expériences ont malheureusement été infructueuses. Les amplifiats d'ADN obtenus par PCR à La Réunion pouvaient donc provenir de l'amplification d'autres organismes présents dans la canne à sucre car les amorces utilisées n'étaient pas suffisamment spécifiques. En conséquence, il a été décidé 1/ de ne pas prendre en compte ces résultats sur le SCYP à La Réunion, 2/ de garder à l'esprit qu'un second agent pathogène pourrait être associé au syndrome de la feuille jaune sur l'île et 3/ de poursuivre les recherches sur le SCYP dès que des outils plus fiables seraient disponibles.

En se basant sur ces résultats, et étant donné que le syndrome de la feuille jaune était encore très mal connu dans le monde, nous avons voulu poursuivre les travaux sur cette maladie en privilégiant quatre grands axes de recherche : 1/ l'impact économique de la maladie sur les principaux cultivars de La Réunion, 2/ la dynamique virale au sein d'une plante-hôte et d'une population de plantes-hôtes, 3/ la vécction de la maladie à La Réunion et 4/ la diversité génétique du SCYLV.

- L'effet du virus sur des plantes infectées, en comparaison avec des plantes saines, a été déterminé grâce au suivi du pathosystème (SCYLV/canne à sucre) dans une expérimentation au

champ sur un cycle de récolte. Divers paramètres ont été considérés comme la symptomatologie (conditions d'apparition, intensité...), les caractéristiques du développement des plantes (croissance des tiges : hauteur et diamètre), les composantes du rendement (nombre et poids des tiges) et la richesse en sucres (Brix, Pol, fibres, pureté).

- La dynamique virale dans la plante et dans le temps a fait l'objet d'expérimentation en serre étanche aux insectes. En parallèle, un suivi de la progression des taux d'infection a été effectué dans des parcelles de production entre 1998 et 2001.
- La transmission du SCYLV par les insectes vecteurs a été étudiée grâce à la collecte et à l'identification des pucerons (insectes vecteurs des *Luteoviridae*) présents dans les champs de canne à sucre à La Réunion. Nous avons ensuite déterminé si ces pucerons étaient porteurs ou non du SCYLV. De plus, un essai constitué de plantes indemnes de SCYLV a été mis en place au champ afin d'obtenir des données sur la contamination, en conditions naturelles de culture, d'un cultivar sensible à la maladie (R575).
- L'étude de la diversité génétique du SCYLV à La Réunion a été réalisée avec 48 isolats viraux prélevés à La Réunion, en comparaison avec 24 isolats viraux originaires d'autres zones géographiques dans le monde.

L'acquisition de ces connaissances est indispensable à l'évaluation des dégâts potentiels de la maladie dans l'île et, si besoin est, à la mise en œuvre de techniques de lutte rationnelles, soit par des méthodes associant sélection sanitaire et prophylaxie, soit par l'utilisation de la résistance variétale.

II. CHAPITRE 1 : IMPACT DU SCYLV SUR LA PLANTE HÔTE

1. Introduction

Plusieurs pays producteurs de canne à sucre ont mis en évidence des pertes de rendement importantes dues à la présence du YLS. Les pertes en tonnage de canne à sucre se situaient au Brésil entre 40 et 60% pour le cultivar SP71-6163 (Burnquist et Vega, 1996 ; Vega *et al.*, 1997), bien que ces chiffres soient revus à la baisse actuellement (Matsuoka et Meneghin, 1999). En Colombie, les pertes ont été estimées entre 16 et 33% selon les cultivars (Jorge Victoria, communication personnelle). En Louisiane, 6 à 14% de perte en sucres ont été mis en évidence pour le cultivar LCP82-89 selon le cycle de culture (Grisham *et al.*, 2000). Enfin, à Hawaii, des différences de croissance et d'assimilation chlorophyllienne entre des plantes infectées par le SCYLV et des plantes saines ont été observés et ce, avant l'apparition des symptômes pour le cultivar H87-4094 (Lehrer *et al.*, 2000). Des études physiologiques complémentaires sur le même cultivar ont montré que les feuilles des plantes infectées par rapport à des feuilles saines avaient des taux d'hydrates de carbone plus élevés, un rapport de chlorophylles a/b et une capacité photosynthétique plus faibles traduisant une baisse de la quantité d'assimilats exportée dans la plante infectée par le SCYLV (Lehrer *et al.*, 2001b).

Il est probable qu'un jaunissement des jeunes feuilles de canne à sucre avant la maturité des tiges provoque une baisse de l'assimilation photosynthétique, d'autant que celle-ci est principalement assurée par les plus jeunes feuilles. Les plantes infectées qui présentent des symptômes auraient ainsi une croissance plus faible par rapport aux plantes sans symptômes (Photo 10), ce qui provoquerait une perte de rendement en tonnage de canne à sucre. De plus, la présence de particules virales dans les vaisseaux de phloème aurait pour conséquence une gêne du flux de sève. Celle-ci conduirait à une limitation de la croissance de la plante et un détournement de la production de sucres vers les feuilles au détriment des autres organes de la plante (Campbell, 1925 ; Esau, 1957 ; Sheffield, 1943). Une accumulation anormale de sucre dans la canne à sucre avait déjà été observée lors de la découverte du YLS en Floride en 1994 (Comstock *et al.*, 1994). A cette époque, aucun agent causal n'avait été identifié mais il avait été démontré que les plantes présentant des jaunissements avaient des taux de Brix (pourcentage de sucres totaux) deux à trois fois supérieurs au taux normal. Il a été prouvé plus tard que les jaunissements des nervures de canne à sucre en Floride étaient causés par le SCYLV (Comstock *et al.*, 1998). Ce phénomène a également été démontré en Louisiane en comparant le Brix du jus de feuilles infectées par le SCYLV au Brix du jus de feuilles indemnes de SCYLV (Grisham *et al.*, 2000). Il en résulterait donc que les feuilles malades seraient plus sucrées que les feuilles saines. Cela a aussi été prouvé pour les infections dues au SCYP pour lesquelles les valeurs de Brix du jus des feuilles infectées étaient toujours supérieures ou égales à 8 (Peralta *et al.*, 2000). Etant donné que seules les tiges sont envoyées à l'usine pour l'extraction du sucre et qu'elles sont moins sucrées, le YLS provoque des pertes de sucre liées à son action sur la croissance des tiges mais aussi à son effet sur l'accumulation du sucre dans la plante.

Une expérimentation a été mise en place à La Réunion dans le but d'analyser l'impact du SCYLV sur les principaux cultivars réunionnais. Le comportement de cannes à sucre infectées par le SCYLV a été comparé à celui de cannes à sucre indemnes de la maladie. Divers paramètres ont été pris en compte comme les critères agronomiques de croissance et la richesse en sucres.

Les cas d'association entre plusieurs virus appartenant à des familles différentes n'est pas rare dans la nature et ont été étudiés (Lecoq *et al.*, 1992). Par exemple, l'association entre le CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellow virus*) et des virus de la famille des *Potyviridae* comme le ZYMV

(*Zucchini yellow mosaic virus*), augmente considérablement les concentrations de particules de CABYV dans la plante (Bourdin et Lecoq, 1994). Ces deux virus à ARN simple brin ont des modes de transmission et une répartition dans la plante très différentes. En effet, les *Potyviridae* sont transmis de façon mécanique alors que les *Luteoviridae* ne le sont pas. Les particules virales des *Potyviridae* colonisent toutes les cellules alors que ceux des *Luteoviridae* colonisent uniquement les faisceaux de phloème (Semal, 1989). La canne à sucre est l'hôte d'au moins huit virus (Rott *et al.*, 2000). Parmi ceux-ci, on trouve à la fois un *Luteoviridae*, (le SCYLV) et des *Potyviridae* comme le SCMV (*Sugarcane mosaic virus*). La présence simultanée du SCYLV et du SCMV a été signalée dans plusieurs pays comme l'Australie, l'Argentine, le Brésil, le Pérou, l'Afrique du Sud, La Réunion... Dans la nature, des cannes à sucre pourraient donc être infectées simultanément par les deux agents pathogènes. Une expérimentation a donc été mise en place pour étudier l'impact du SCMV sur la charge du SCYLV dans la plante et l'expression des symptômes de YLS.

2. Les *Luteoviridae* et leur impact sur le rendement

Les symptômes majeurs des infections dues aux *Luteoviridae* sont des enroulements, des rabougrissements et des jaunissements (quelquefois des rougissemens) foliaires ; cependant une réduction du système racinaire et un nanisme des plantes virosées sont également observés (Harrison, 1999). Ces symptômes ressemblent à ceux liés à des déficiences nutritives ou à des dommages provoqués par des insectes. De ce fait, ces maladies virales ont souvent été découvertes tardivement. Ce fut le cas du CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) dont la première description a été faite en 1992, mais avec des échantillons prélevés dix ans plus tôt (Lecoq *et al.*, 1992).

Il existe actuellement 19 virus recensés dans la famille des *Luteoviridae* qui est composée de trois genres : *Luteovirus*, *Polerovirus* et *Enamovirus* (Harrison, 1999). Les premiers symptômes attribués à cette famille sont ceux du "potato curl" en Europe dans la seconde moitié du 18^{ème} siècle. En 1790, la présence simultanée du PLRV (*Potato leafroll virus*) et du PVY (*Potato virus Y*) a causé plus de 75% de pertes chez la pomme de terre dans le Nord de l'Angleterre. La nature infectieuse de la maladie a été mise en évidence en 1916 (Quanter, 1916) et, en 1920, il a été montré que l'agent causal était transmis par un puceron (Oortwijn Botjes, 1920). De 1951 à 1953, des jaunissements foliaires dus au BYDV (*Barley yellow dwarf virus*) ont été découverts sur l'orge et une transmission par les pucerons de manière circulante et persistante fut démontrée. La jaunisse nanisante de l'orge est aujourd'hui la maladie la plus grave sur céréales dans le monde. Elle touche 100 espèces de la famille des *Poaceae* et 25 espèces de pucerons sont capables de la transmettre (Harrison, 1999).

La famille des *Luteoviridae* est le groupe de phytovirus qui cause les plus grandes pertes économiques. D'une manière générale, il a été démontré que les pertes de rendement variaient selon les espèces et les cultivars et selon la physiologie de la plante hôte (Smith et Barker, 1999). Par exemple, le CABYV cause 50% de perte dans les plantations de concombre mais seulement 15% dans les plantations de melon. Le nombre de fleurs et de fruits produits par plante est considérablement réduit mais la qualité des fruits n'est pas affectée (Lecoq *et al.*, 1992). Les infections mixtes du CABYV avec d'autres virus de la famille des *Potyviridae* sont très courantes dans la nature et modifient l'incidence de la maladie.

L'incidence des "jaunisses" sur la betterave à sucre a également été étudiée car elles représentent le problème le plus sérieux sur betterave à sucre en Angleterre et ce, malgré un excellent contrôle des insectes vecteurs (Smith et Hallsworth, 1990). Ainsi, l'impact du BMYV (*Beet mild yellowing virus*) et du BYV (*Beet yellow virus*) sur le rendement de betterave à sucre a été étudié au champ entre 1985 et 1987. Il a été montré qu'une inoculation en début ou à la mi-saison faisait apparaître les symptômes de manière plus marquée et faisait surtout baisser le

rendement en sucres de 47% pour une infection due au BYV et de 29% pour une infection due au BMYV. De plus, suite à l'infection par l'un de ces deux virus, une augmentation des impuretés (sodium, potassium et azote) dans le jus a été observée. Cette situation a rendu plus difficile l'extraction des sucres, car ces derniers influent sur le pH lors des différentes étapes d'extraction du sucre. En revanche, la multiplication virale est beaucoup moins active sur des plantes adultes que dans des jeunes plantes et c'est pourquoi une inoculation en fin de saison est sans effet significatif sur les pertes de rendement. Une différence variétale dans la résistance à l'infection a été mise en évidence pour le BYV mais pas pour le BMYV. Les pertes de rendement sont ainsi déterminées par le type de virus, la date d'infection et la sensibilité du cultivar. En 1974, une infection sévère a touché 67% de la production de betterave anglaise causant environ 50% de pertes (Robert et Lemaire, 1999). Les traitements insecticides ont eu peu d'efficacité sur les vecteurs à cause de la présence de biotypes résistants. En 1994, l'enrobage des semences par des insecticides a cependant considérablement réduit l'impact de la maladie.

Les effets du PLRV sur les rendements de pomme de terre ont été étudiés en champ (Killick, 1979). Une réduction importante du nombre de tiges et du nombre de tubercules par plante, ainsi qu'une diminution du poids des tubercules, ont été mises en évidence ; mais il existait de grandes variations selon les différents cultivars étudiés. Ces résultats ont confirmé des travaux antérieurs révélant des pertes de rendement au champ de 29% pour le cultivar Flourball, mais de 98% pour le cultivar King Edward (Loughnane, 1941).

L'étude de l'impact des *Luteoviridae* n'a pas uniquement été limitée à l'incidence sur les rendements. Des études de physiologie ont aussi été réalisées. C'est ainsi qu'il a été démontré que la présence du BYDV dans une variété d'orge sensible entraîne une baisse de la photosynthèse, du taux de chlorophylles et de la surface foliaire, ainsi qu'une augmentation du poids sec et de la respiration au niveau foliaire (Jensen, 1969). Les premiers symptômes d'une infection par le BYDV se situent au niveau du phloème et ils sont visibles deux semaines après l'infection (Esau, 1957). Les faisceaux de phloème infectés par le BYDV ne présentent pas de changements cytologiques mais des nécroses importantes qui peuvent bloquer le développement de tout le système vasculaire. Ces nécroses sont simplement la conséquence de l'accumulation de gomme provoquée par la présence des particules virales. Les particules du BYDV interfèrent donc avec les fonctions phloémiques et perturbent ainsi la translocation (Jensen, 1969). D'autres études sur le PLRV ont montré que la présence des particules virales dans le phloème stimule temporairement la photosynthèse, d'où une augmentation des sucres qui s'accumulent dans les feuilles sans pouvoir être transportés : les feuilles deviennent alors craquantes et sucrées et la teneur en eau de ces dernières baisse significativement (Campbell, 1925). Chez l'orge infecté par le BYDV, ce phénomène a également été observé, et les accumulations de glucides ont un effet direct sur l'augmentation du poids sec des feuilles malades et un effet indirect avec la mise en place d'un mécanisme de "feedback" inhibant la photosynthèse et augmentant la respiration (Jensen, 1969).

En matière de lutte contre les *Luteoviridae*, on préconise à court terme des mesures prophylactiques associées à des traitements chimiques contre les insectes vecteurs (Smith et Barker, 1999). L'emploi d'insecticides dirigés contre le vecteur est un moyen peu efficace pour le contrôle de l'épidémie primaire car l'effet toxique n'est pas toujours suffisamment rapide pour empêcher l'inoculation de virus. En revanche, les insecticides peuvent réduire l'épidémie secondaire (Chapitre 3). A plus long terme, la sélection variétale reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les maladies virales.

Les mesures prophylactiques existantes sont valables pour un grand nombre de phytovirus et ont pour but de faire baisser la pression d'inoculum. On préconise 1/ la plantation

de plantes saines, 2/ la thermothérapie, 3/ l'arrachage et la destruction des plantes virosées, 4/ l'élimination de plantes sauvages réservoirs, 5/ l'assainissement des plantes infectées par culture de tissus pour ne pas réduire le potentiel génétique et enfin 6/ le décalage de la date de plantation pour que le stade de grande sensibilité des plantes (plante jeune) ne coïncide plus avec la période de vols des insectes vecteurs. En Afrique du Sud, lorsque l'on décale la période de plantation des cultivars de canne à sucre sensibles à la mosaïque, on réduit considérablement les pertes de rendement (Ricaud *et al.*, 1989). Dans ce pays, les périodes de vol des pucerons ont lieu à la fin de l'été jusqu'au début de l'automne et cette période correspond au stade physiologique (jeune plantes âgées de 6 à 12 semaines) le plus adéquat à la prise de nourriture des insectes vecteurs (Bailey et Fox, 1980). Cependant étant donné que l'incidence des maladies à *Luteoviridae* est généralement très variable selon le cultivar infecté, l'utilisation de variétés tolérantes ou résistantes semble plus adaptée à long terme. Certains auteurs pensent néanmoins que les variétés tolérantes représentent un réservoir d'inoculum qui pourrait être potentiellement dangereux (Robert et Lemaire, 1999).

Enfin, l'approche biotechnologique a également été utilisée pour tenter d'obtenir des plantes résistantes en y introduisant différents gènes d'origine virale. D'une manière générale, deux approches ont été étudiées, soit en introduisant dans la plante un gène codant pour la protéine de capsidé (CP) conférant aux plantes transformées une résistance souvent incomplète, soit en introduisant un gène codant pour la polymérase (RdRp). Ce dernier confère aux plantes transformées une résistance complète, mais seulement à l'égard des souches virales ayant beaucoup d'homologie. Pour éviter l'utilisation exclusive de ces deux gènes viraux, de plus en plus d'études sont entreprises pour utiliser tous les gènes possibles pour la résistance aux virus de la famille des *Luteoviridae* causant des pertes économiques importantes.

Pour le PLRV par exemple, l'intégration du gène de la CP dans la pomme de terre a permis une résistance à l'accumulation virale selon des mécanismes encore mal connus. L'introduction d'autres gènes du PLRV comme le gène codant pour la protéine de mouvement, ou le gène codant pour la polymérase, ont également permis d'obtenir une résistance à l'infection (Barker et Waterhouse, 1999). Le gène codant pour la protéine de capsidé du BYDV-PAV, du BYDV-MAV et du CYDV-RPV a été introduit dans des plants d'avoine et d'orge (McGrath *et al.*, 1997). Certaines lignées d'avoine et d'orge ont été définies comme résistantes car on n'y détectait plus que de faibles concentrations en particules virales.

L'utilisation de plantes transgéniques résistantes aux *Luteoviridae* pose cependant des problèmes potentiels comme 1/ les interactions au sein de la plante entre la protéine transgène et le virus infectant pouvant causer de nouvelles maladies, 2/ la fuite de gènes par des croisements polliniques entre la plante transformée et les mauvaises herbes environnantes et 3/ la recombinaison entre l'ARNm du transgène et celui du génome du virus infectant créant un nouveau virus ou de nouvelles maladies (Miller *et al.*, 1997).

3. Matériel et méthodes

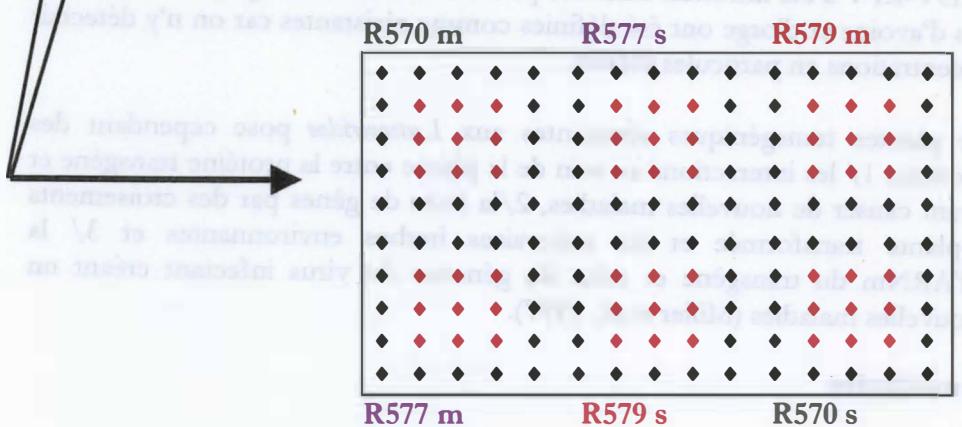
3.1. Matériel

Les trois principaux cultivars de canne à sucre de l'île de La Réunion ont été utilisés : R570, R577 et R579. Deux boutures à deux bourgeons ont été plantées à chaque emplacement qui était espacé par rapport au suivant de 0,75 m dans le sens de la longueur et de 1,5 m dans le sens de la largeur (Photo 7). Les boutures ont été prélevées sur des tiges de canne à sucre âgées de 11 à 12 mois sur les sites de La Mare (R570), de Saint-Benoît (R579) et de Vue-Belle (R577). L'essai a été mis en place à La Mare, sur la station expérimentale du CIRAD en novembre 1998, avec un système d'irrigation goutte-à-goutte et une fertilisation lors de la plantation avec de un

R570 m	R577 s	R579 m	Bloc 1a
R577 m	R579 s	R570 s	
R577 s	R570 m	R579 s	
R579 m	R577 m	R570 s	
R577 s	R570 s	R579 s	
R570 m	R577 m	R579 m	
R579 s	R570 m	R577 m	
R570 s	R579 m	R577 s	
R579 m	R577 s	R570 m	
R577 m	R579 s	R570 s	
R570 m	R577 s	R579 m	
R577 m	R579 s	R570 s	
R570 m	R577 s	R579 m	Bloc 6a
R570 s	R577 m	R579 s	
R570 m	R577 s	R579 m	Bloc 1b
R577 m	R579 s	R570 s	
R577 s	R570 m	R579 s	Bloc 2b
R579 m	R577 m	R570 s	
R577 s	R570 s	R579 s	Bloc 3b
R570 m	R577 m	R579 m	
R579 s	R570 m	R577 m	Bloc 4b
R570 s	R579 m	R577 s	
R579 m	R577 s	R570 m	Bloc 5b
R577 m	R579 s	R570 s	
R570 m	R577 s	R579 m	Bloc 6b
R570 s	R577 m	R579 s	

m : plantes malades, s : plantes saines

Figure 8 : Plan de l'expérimentation "impact du SCYLV sur la canne à sucre"



m : plantes malades, s : plantes saines,

♦ et ◆ : emplacement des boutures de canne à sucre,

◆ : touffes de canne à sucre ayant fait l'objet d'analyses

Détail d'un des deux sous-bloc 1 (a ou b)

En vert : R570, en rouge : R579, en bleu : R577, m : plantes malades, s : plantes saines, en noir : état sanitaire des touffes de canne à sucre non conforme aux prévisions, : absence de germination des boutures, : souches de canne à sucre choisies pour les mesures, B : Bloc

Figure 9: Emplacements des souches de canne à sucre choisies pour les mesures (essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre")

En vert : R570, en rouge : R579, en bleu : R577, m : plantes malades, s : plantes saines, en noir : état sanitaire des touffes de canne à sucre non conforme aux prévisions,  : absence de germination des boutures,  : souches de canne à sucre choisies pour les mesures, B : Bloc

Figure 9 (suite et fin) : Emplacements des souches de canne à sucre choisies pour les mesures (essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre")

engrais complexe 15/12/24 à raison de 1000 kg par hectare. La feuille F1 (première feuille déroulée avec ochréa visible au sommet de la tige) a été utilisée pour détecter la présence du SCYLV (Photo 4) mais l'ensemble du feuillage de chaque tige a été pris en compte pour étudier les symptômes.

Pour l'expérience de co-infection entre le SCMV et le SCYLV, deux cultivars de canne à sucre cultivés au Pérou ont été utilisés : H32-8560 et H50-7209.

3.2. Méthodes

3.2.1. Dispositif expérimental

Un dispositif factoriel en 6 blocs complets (chaque bloc était composé de deux sous-blocs a et b) a été mis en place avec les traitements suivants : trois cultivars (R570, R579 et R577) et deux modalités d'infection (boutures saines et boutures infectées). Chaque unité expérimentale (un cultivar et une modalité d'infection) était composée de 18 touffes de cannes à sucre avec 9 touffes par sous-bloc. Chaque série de 9 touffes était entourée par 16 touffes constituant une bordure (Figure 8).

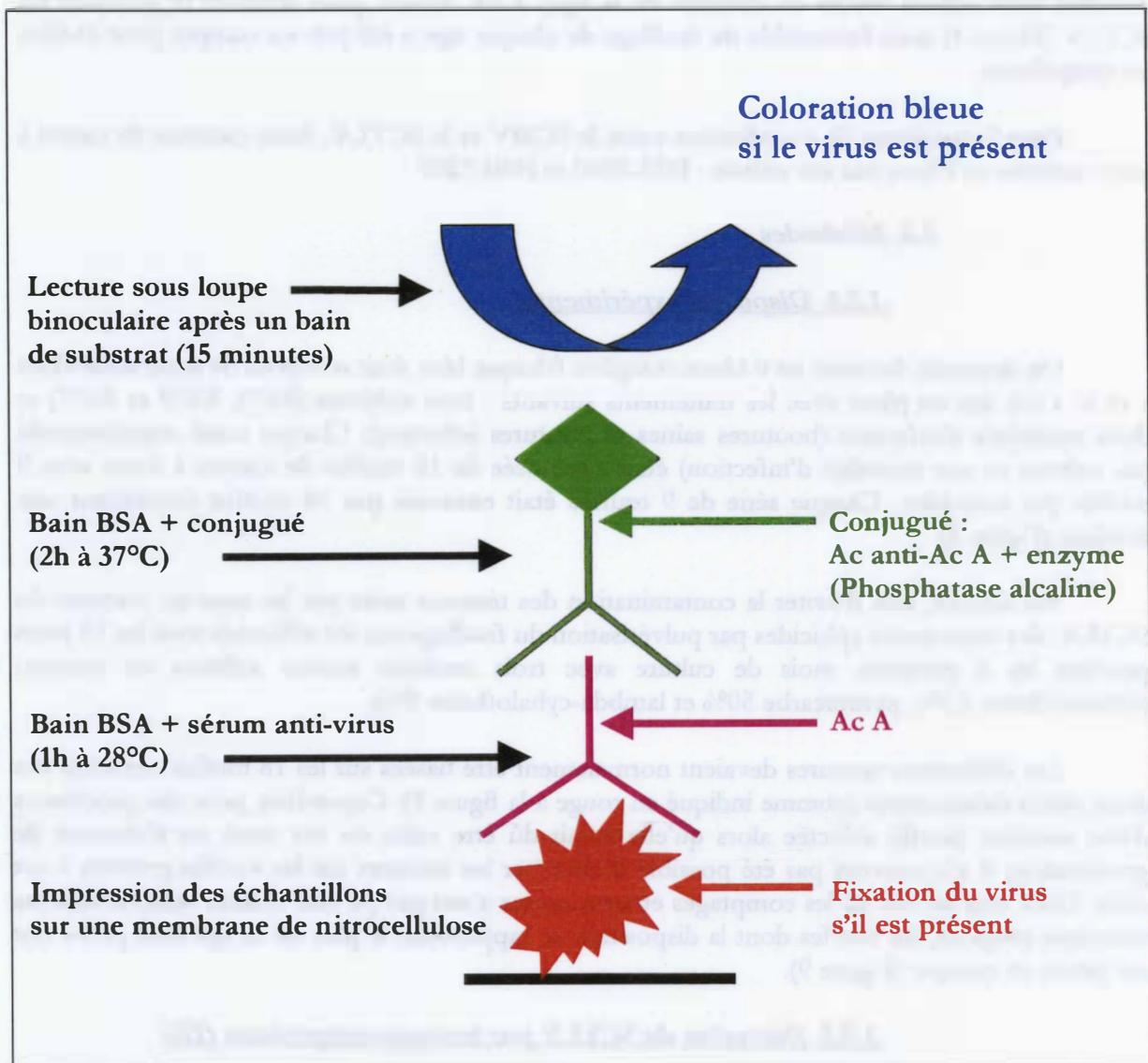
Par ailleurs, afin d'éviter la contamination des témoins sains par les insectes vecteurs du SCYLV, des traitements aphicides par pulvérisation du feuillage ont été effectués tous les 15 jours pendant les 6 premiers mois de culture avec trois matières actives utilisées en rotation (deltaméthrine 2,5%, pyrimicarbe 50% et lambda-cyhalothrine 5%).

Les différentes mesures devaient normalement être basées sur les 18 touffes centrales des deux unités élémentaires (comme indiqué en rouge à la figure 8). Cependant, pour des problèmes d'état sanitaire (touffe infectée alors qu'elle aurait dû être saine ou *vice versa*) ou d'absence de germination, il n'a souvent pas été possible d'effectuer les mesures sur les touffes prévues à cet effet. Dans tous les cas où les comptages et les mesures n'ont pas pu être réalisés selon le schéma théorique proposé, les touffes dont la disposition se rapprochait le plus de ce qui était prévu ont été prises en compte (Figure 9).

3.2.2. Détection du SCYLV par immuno-empreintes (IE)

L'IE est une technique sérologique ELISA basée sur l'utilisation d'une membrane de nitrocellulose (Photo 5) et d'un sérum polyclonal anti-SCYLV (Schenck *et al.*, 1997). Ce dernier a été produit à partir de virus partiellement purifié par l'équipe du Professeur Lockhart de l'Université du Minnesota (USA). Le protocole opératoire (Figure 10) est le suivant : le limbe de la feuille F1 a été éliminé pour ne conserver que la nervure centrale et une section transversale de celle-ci a été faite à l'aide d'un scalpel stérile. Une empreinte de cette section a été réalisée en appliquant fermement la nervure pendant quelques secondes sur une membrane de nitrocellulose (*Protan BA 85 cellulosenitrate, 0.45 µm, Schleicher et Schuell*). La membrane a ensuite été utilisée pour le traitement sérologique ou conservée à 4°C dans une boîte hermétique pendant deux mois maximum.

Pour la révélation, tous les produits qui ont été utilisés étaient des produits Sigma. La membrane a d'abord été mise à tremper pendant une heure à 28°C dans le tampon de blocage TBS-T (50 mM de Tris, 50 mM de NaCl à pH 7,5 et 0,05% de Tween-20) et 5% de bovine serum albumine (BSA). La membrane a ensuite été rincée au TBS-T à trois reprises pendant 5 minutes. Puis elle a été mise à tremper dans du sérum anti-SCYLV (Lockhart, communication personnelle) dilué au 1/10000 dans du TBS-T avec 1% de BSA pendant une nuit à 4°C. La membrane a



BSA : Bovine serum albumine, Ac : anticorps

Figure 10 : Principe de l'immuno-empreinte

ensuite été rincée comme précédemment puis elle a été immergée dans le conjugué phosphatase alcaline GAR9919 dilué au 1/1000 dans du TBS-T pendant deux heures à 37°C. Après un nouveau rinçage de 5 minutes avec du tampon TBS-T, la membrane a été placée pendant 10 minutes à température ambiante dans le substrat (24 g/l de Tris à pH 9,1, 0,3 g de naphthol AS phosphate dissout dans 5 ml de N,N diméthylformamide, 5 ml/l de MgCl₂ à 0,1M et 0,1 g/l de Fast Blue). La membrane a été ensuite observée sous la loupe binoculaire ($\times 40$). La présence du SCYLV dans la nervure foliaire était visualisée par la présence de petits points bleus dans les faisceaux du phloème (Photo 6). Dès lors qu'un faisceau vasculaire du phloème était coloré en bleu, l'échantillon était considéré comme infecté par le SCYLV.

L'ensemble des touffes plantées a été analysé par IE à raison de cinq feuilles F1 par touffe de canne à sucre. Une touffe était considérée comme infectée dès qu'une de ses tiges était positive en IE.

3.2.3. Symptomatologie

Pour chaque touffe analysée, les symptômes ont été notés tige à tige selon le degré de jaunissement sur l'ensemble du feuillage. La sévérité des symptômes a été notée sur une échelle de 0 à 4 (Photo 2) :

0 = pas de jaunissements

1 = feuillage présentant des jaunissements pâles de la partie centrale de la nervure principale (face abaxiale)

2 = feuillage présentant des jaunissements pâles de toute la surface de la nervure principale (face abaxiale)

3 = feuillage présentant des jaunissements foncés de toute la surface de la nervure principale (face abaxiale)

4 = feuillage présentant des jaunissements ou des rougissements sur toute la feuille (faces abaxiale et adaxiale)

3.2.4. Nombre de tiges par touffe de canne à sucre

Seules les tiges usinables ont été prises en compte car une bonne partie des tiges non usinables étaient mortes à cause du sevrage (arrêt de l'irrigation 6 semaines avant la coupe).

3.2.5. Hauteur et diamètre des tiges

Un ruban gradué a été utilisé pour mesurer la hauteur des tiges usinables (distance entre le sol et l'ochréa de la feuille F1). Un pied à coulisse a été utilisé pour mesurer le diamètre sur le côté arrondi de l'entre-nœud médian de ces mêmes tiges (Photos 8 et 9).

3.2.6. Poids des tiges

Toutes les tiges usinables de chaque touffe analysée ont été coupées au niveau du sol à l'aide d'une machette. Le feuillage a été éliminé et les tiges ont été pesées à l'aide d'un pèse-personne.

3.2.7. Richesse en sucres

Pour chaque sous-bloc, une série de 20 tiges usinables a été prélevée au hasard parmi les neuf touffes analysées. Leur teneur en sucres a été déterminée par le CERF (Centre d'Essai, de Recherche et de Formation, Sainte-Clotilde - Réunion) selon la méthode décrite par Hoarau (Hoarau, 1969). Chaque analyse a été répétée une fois, et ainsi un total de quatre analyses a été effectué par unité expérimentale (un cultivar et une modalité d'infection).

Trois valeurs sont utilisées pour exprimer le taux de sucre dans le jus : 1/ le Brix réfractométrique qui est mesuré avec un réfractomètre et qui correspond au taux de matières solides dissoutes (sucres totaux), 2/ le Pol qui est mesuré à l'aide d'un polarimètre et qui représente le pourcentage de saccharose dans les matières solubles totales (ces deux valeurs sont recalculées par rapport à la masse de canne à sucre après correction des températures de mesures), 3/ la richesse saccharine qui est, en théorie, le pourcentage de saccharose dans la canne à sucre (pourcentage de sucres extractibles). Le rapport du Pol sur le Brix permet quant à lui, de préciser la pureté du jus de canne à sucre. La pesée des résidus obtenus après l'extraction du jus permet de définir la teneur en fibres.

3.2.8. Analyses statistiques

Une analyse de variance (Test de Student à 5%) a été réalisée pour chaque paramètre, en utilisant la moyenne des 18 touffes mesurées pour chacun des six blocs constituant l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre". Elle a été réalisé par le service de "méthodologie" du CIRAD à Montpellier avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA).

3.2.9. Co-infection SCMV/SCYLV

Deux cultivars de canne à sucre infectés par le SCYLV et originaires du Pérou (H32-8560 et H50-7209) ont été plantés en pots dans une serre à raison de 10 boutures à un bourgeon par cultivar. Le substrat était constitué d'un mélange de terreau à motte N2, de tourbe blonde et de pouzzolane (1 :1 :1, vol/vol/vol). Les plantes étaient alimentées une fois par semaine par une solution nutritive (engrais NPK 17/7/22 Algospeed® : 10 g, chélate de fer EDDHA 6% Ferveg6® : 2,5 g, oligoéléments Hortrilon® : 2,5 g, eau : qsp 10 l) et arrosées au goutte-à-goutte. Les deux cultivars infectés par le SCYLV avaient la particularité de présenter des symptômes sévères et précoces de YLS surtout le cultivar H50-7209 (Alegria *et al.*, 2000). Trois semaines après la germination des boutures, cinq plantes de chaque cultivar ont été inoculées avec la souche Cam6 de SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) originaire du Cameroun, selon le protocole suivant : 4 g de limbe de feuilles de canne à sucre (cultivar B46364) infectées par le SCMV ont été prélevés et broyés dans 1 ml de tampon phosphate (90 ml d'eau distillée contenant 3,5 g de PO₄KH₂, 6,5 g de PO₄Na₂H, 12H₂O et 0,2 ml de β-mercaptopropanol, pH 7,2). Les feuilles F1 des cannes à sucre déjà infectées par le SCYLV ont été inoculées mécaniquement avec 1 ml du broyat contenant les particules du SCMV à l'aide de carborundum (poudre abrasive). On disposait donc pour chaque cultivar de cinq plantes infectées uniquement par du SCYLV et de 5 plantes infectées par les deux virus. Deux plantes du cultivar B46364 (cultivar très sensible au SCMV) ont été utilisées comme témoins et ont été inoculées uniquement avec du SCMV. Ce cultivar a été retenu car aucune plante des cultivars H32-8560 et H50-7209 indemnes de SCYLV n'était disponible. La présence des particules virales du SCMV et du SCYLV a été recherchée sur la partie distale des feuilles F1 à l'aide de la technique des IE pendant deux mois à raison d'une analyse tous les 15 jours.

Tableau 1 : Etat sanitaire des champs de canne à sucre utilisés comme source de boutures pour la plantation de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre"

Localité	Nombre de tiges infectées par le SCYLV/nombre total de tiges testées, pour le cultivar			
	R570	R575	R577	R579
Saint-Benoît (station CERF)	305/315 (97%)	174/175 (99%)		412/665 (62%)
Vue-Belle (station CERF)			240/2400 (10%)	
La Mare (station CIRAD)	302/570 (53%)			

Tableau 2 : Etat sanitaire des cannes à sucre de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" avant la récolte

Paramètre	Cultivar			
	R570	R577	R579	Total
Nombre de touffes plantées	600	600	600	1800
Nombre de touffes ayant germé	525	529	496	1550
Nombre de touffes n'ayant pas germé (%)	75 (12,5%)	71 (11,9%)	104 (17,3%)	250 (13,9%)
Nombre de touffes saines devenues virosées (%)	88 (16,8%)	29 (5,5%)	31 (6,25%)	148 (9,6%)
Nombre de touffes virosées devenues saines (%)	6 (1,1%)	4 (0,8%)	14 (2,8%)	24 (1,6%)

En vert : R570, en rouge : R579, en bleu : R577, m : plantes malades, s : plantes saines, en noir : état sanitaire des touffes de canne à sucre non conforme aux prévisions, : absence de germination des boutures, B : Bloc

Figure 11 : Etat sanitaire de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" avant la récolte

En vert : R570, en rouge : R579, en bleu : R577, m : plantes malades, s : plantes saines, en noir : état sanitaire des touffes de canne à sucre non conforme aux prévisions. : absence de germination des boutures. B : Bloc

Figure 11 (suite et fin) : Etat sanitaire de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" avant la récolte.

4. Résultats

4.1. Prospection

Une prospection a eu lieu dans des parcelles de production afin d'identifier des tiges de cannes à sucre saines et virosées, et de produire les boutures nécessaires à la mise en place de l'essai (Tableau 1). Etant donné que 50% de tiges saines et 50% de tiges infectées étaient requises pour mettre en place l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre", les tiges de R570 ont été prises à La Mare où le taux d'infection était de 53% (contre 97% à Saint-Benoit). Le cultivar R575 n'a pas pu être planté faute de tiges saines en quantité suffisante ; il a donc été remplacé par le cultivar R577 dont les tiges ont été prélevées sur le site de Vue-Belle. Le cultivar R579 a été prélevé à Saint-Benoit.

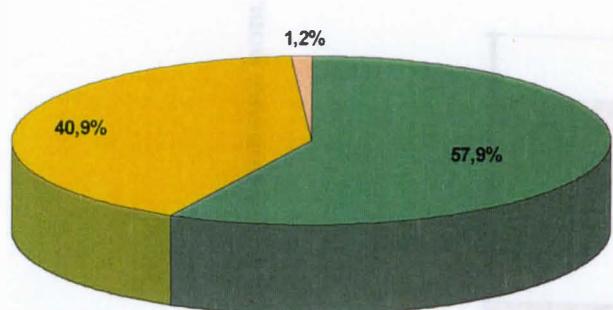
4.2. Pourcentage de germination et état sanitaire

Un pourcentage élevé (14%) de touffes plantées n'a pas germé (Tableau 2 et Figure 11). Ce résultat est à relier à l'absence d'irrigation sur une ligne de canne à sucre à cause d'un problème technique lors de la plantation. Lorsque cette ligne n'est pas prise en compte lors des analyses statistiques, le pourcentage de non-germination n'est plus que de 6,5%, ce qui est tout à fait correct pour des expérimentations mises en place à La Réunion. R579 est le cultivar qui a le pourcentage de germination le plus faible, 83% contre 88% pour les deux autres cultivars. Etant donné que toutes les boutures avaient approximativement le même âge, l'hypothèse de l'influence de l'âge des boutures est *a priori* à exclure. En revanche, les boutures provenaient de lieux différents et cette origine variable pourrait permettre d'expliquer les différences de taux de germination.

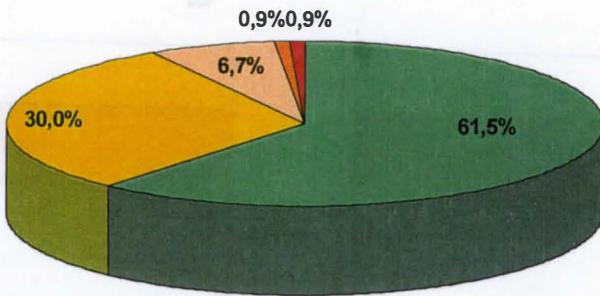
Trois mois après la plantation et avant de procéder à la récolte des tiges de canne à sucre âgées alors de 11 mois, leur état sanitaire a été vérifié (Figure 11). Le résultat obtenu a été similaire lors des deux analyses et un certain nombre de touffes présentait un état sanitaire non conforme aux prévisions : des touffes considérées comme saines à la plantation se sont avérées virosées à la récolte, et *vice versa*. Les cinq tiges testées pour chaque touffe ont généralement présenté le même résultat. Quelques rares exceptions (seulement une ou deux tiges avec un état sanitaire différent des autres tiges testées) ont été observées surtout pour le cultivar R579. Le SCYLV a été détecté dans 6% des touffes issues de boutures saines pour les cultivars R577 et R579, et dans 17% des touffes issues de boutures saines chez le cultivar R570. En revanche, le nombre de touffes virosées à la plantation et dans lesquelles le virus n'a plus été détecté à la récolte est faible : moins de 3%, quel que soit le cultivar.

4.3. Rendement

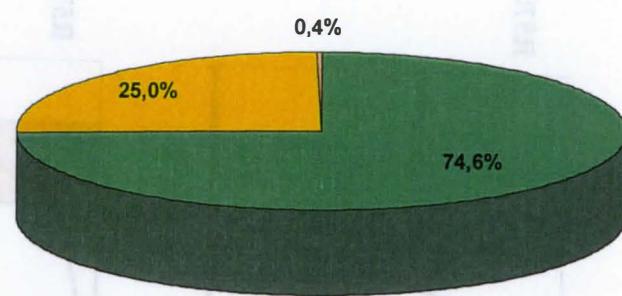
Dix paramètres représentant des caractéristiques agronomiques et de rendement ont été mesurés pour les trois cultivars après 12 mois de croissance au champ (Tableau 3). Les tiges saines et virosées des cultivars R570 et R579 n'étaient pas différentes quel que soit le paramètre considéré. En revanche, pour le cultivar R577, des différences entre touffes saines et touffes virosées ont été mises en évidence pour tous les paramètres, à l'exception du nombre de tiges par touffe et de la pureté du jus. La présence du SCYLV chez le cultivar R577 a fait baisser le rendement par une diminution de la hauteur, du diamètre et du poids des tiges. Le virus a également eu un impact sur la richesse en sucres du cultivar R577 en faisant diminuer le taux de Brix et du Pol et en faisant augmenter les taux de fibres dans les tiges. En revanche, la qualité du jus (pureté) n'a pas semblé être affectée par la présence du SCYLV.



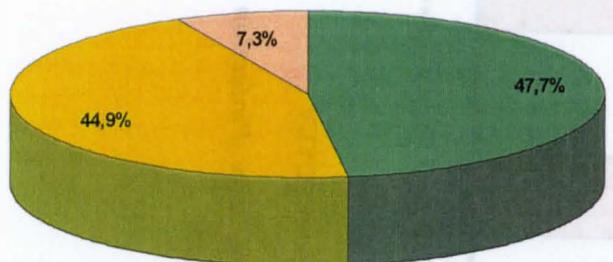
R570 sain



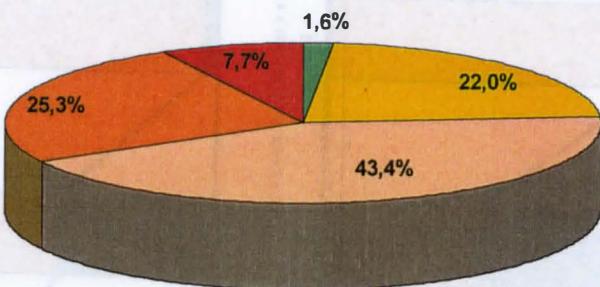
R577 sain



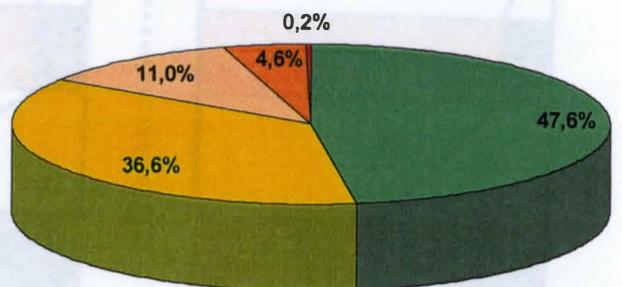
R579 sain



R570 infecté



R577 infecté



R579 infecté

■ note 0 ■ note 1 ■ note 2 ■ note 3 ■ note 4

Figure 12 : Effet du SCYLV sur la sévérité du jaunissement foliaire chez trois cultivars de canne à sucre
(essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre")

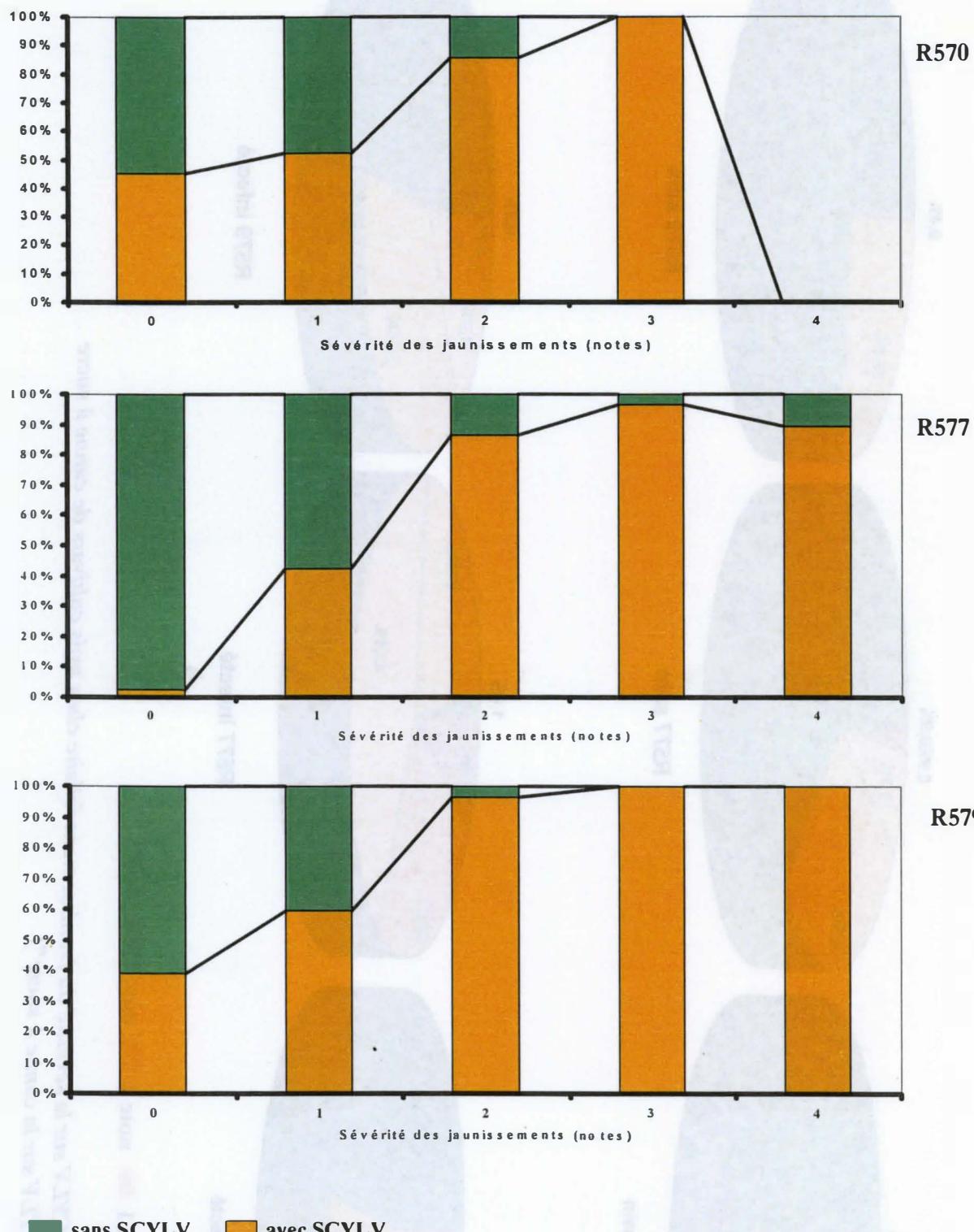


Figure 13 : Variation des taux d'infection selon la sévérité des jaunissements pour trois cultivars de canne à sucre

Tableau 3 : Effet du SCYLV sur les caractéristiques agronomiques et les paramètres de production de trois cultivars de canne à sucre (essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" en vierge)

Paramètre	Cultivars								
	R570			R577			R579		
	Plantes saines	Plantes malades	$\Delta s-m$ (P)	Plantes saines	Plantes malades	$\Delta s-m$ (P)	Plantes saines	Plantes malades	$\Delta s-m$ (P)
Rendement (t/ha)	81,73 *	73,91	7,82 (0,1516)	87,43	67,33	20,10 (0,0124)	104,61	113,25	-8,64 (0,0810)
Nombre de tiges / touffe	7,64	7,92	-0,28 (0,7274)	9,87	9,46	0,41 (0,4347)	9,08	8,72	0,36 (0,4241)
Hauteur de la tige (en cm)	160,21	156,32	3,89 (0,4404)	136,00	122,11	13,89 (0,0001)	164,84	159,74	5,10 (0,3054)
Diamètre de la tige (en mm)	26,15	26,62	-0,47 (0,2325)	25,87	24,06	1,81 (0,0002)	29,51	28,75	0,76 (0,0873)
Poids de la tige (en kg)	1,22	1,04	0,18 (0,1516)	1,03	0,79	0,24 (0,0124)	1,31	1,47	-0,16 (0,0810)
% de sucres extractibles	10,31	10,00	0,31 (0,1643)	10,63	9,43	1,20 (0,0158)	10,50	10,41	0,09 (0,4880)
Brix (% de sucres totaux)	18,47	18,16	0,31 (0,1433)	18,63	17,30	1,33 (0,0225)	18,39	18,40	-0,01 (0,7969)
Pol (% de saccharose)	16,39	16,47	-0,08 (0,1266)	16,81	15,33	1,48 (0,0278)	16,40	16,38	0,02 (0,5974)
Pureté (Pol/Brix)	89,26	88,69	0,57 (0,1073)	90,16	88,70	1,46 (0,2374)	89,12	89,10	0,02 (0,4361)
% Fibres	13,74	13,67	0,07 (0,6011)	13,29	13,88	-0,59 (0,0013)	12,37	12,79	-0,42 (0,1149)

* : moyenne des données pour l'ensemble des 6 blocs ; $\Delta s-m$: différence entre plantes saines et plantes malades, (P) : probabilité ; en gras : probabilité significative au seuil de 5%

Tableau 4 : Effet du SCYLV sur le développement de symptômes chez trois cultivars de canne à sucre (essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre")

Cultivar	Nombre total de tiges non virosées	Nombre de tiges non virosées		Nombre total de tiges virosées	Nombre de tiges virosées	
		sans jaunissements	avec jaunissements		sans jaunissements	avec jaunissements
R570	805	466 (58%)	339 (42%)	857	409 (48%)	448 (52%)
R577	1068	656 (61%)	412 (39%)	1016	16 (2%)	1000 (98%)
R579	1013	756 (75%)	257 (25%)	942	448 (48%)	494 (52%)

Tableau 5 : Suivie d'une co-infection entre le SCYLV et le SCMV sur deux cultivars de canne à sucre du Pérou

N°	Co-infection	Cultivar	SCYLV (1)					SCMV (2)				
			test 1	test 2	test 3	test 4	test 5	test 1	test 2	test 3	test 4	test 5
1	non (3)	H32-8560	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	oui		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
9	oui		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	non (3)	H50-7209	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
12	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
14	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
15	non (3)		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
16	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	oui		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	non (4)	B46364	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
22	non (4)		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(1) : détection de SCYLV dans les faisceaux de phloème de la nervure centrale de feuille F1

(2) : détection de SCMV dans toutes les cellules de la nervure centrale de feuille F1

(3) : SCYLV seul

(4) : SCMV seul

4.4. Symptomatologie

Aucun symptôme de YLS n'était visible pendant les neuf mois de croissance après la plantation. Ce n'est qu'après le sevrage (arrêt de l'irrigation six semaines avant la récolte) que les jaunissements ont commencé à apparaître. Qu'elles soient infectées ou non, les tiges de canne à sucre des différents cultivars ont présenté des symptômes de jaunissement, mais avec des sévérités et des fréquences différentes (Figure 12). En effet, lorsque les tiges étaient non virosées, une minorité d'entre elles présentait des jaunissements : 42%, 39% et 25% respectivement pour les cultivars R570, R577 et R579 (Tableau 4). Ce pourcentage était plus élevé lorsque le SCYLV était présent : 52%, 98% et 52% respectivement pour les cultivars R570, R577 et R579. On notera que ce phénomène était particulièrement marqué pour le cultivar R577 dont presque toutes les tiges présentaient des jaunissements lorsque le SCYLV était présent.

En effectuant une analyse plus détaillée, on constate que les jaunissements observés sur les tiges de canne à sucre saines étaient très faibles (note 1 principalement) et que les jaunissements plus sévères (notes 2 à 4) n'ont été observés que chez les tiges virosées (Figure 12). Le cultivar R577 est le cultivar qui présente une très forte proportion de jaunissements lorsqu'il est infecté, mais aussi un plus grand nombre de jaunissements très sévères (note 4). Il apparaît également que pour les cultivars étudiés, plus les jaunissements sont sévères, plus la probabilité d'y détecter la présence du SCYLV est élevée (Figure 13).

4.5. Co-infection SCMV/SCYLV

Grâce aux tests effectués (IE réalisées tous les 15 jours) pendant une période de 2 mois, il a pu être montré que les particules virales de SCYLV qui se trouvait dans les nervures des feuilles de cannes à sucre n'ont pas influencées par la présence du SCMV (Tableau 5). Bien que notre méthode d'analyse ne soit pas quantitative, les concentrations virales du SCYLV n'ont visiblement pas augmenté : la totalité des faisceaux de phloème étaient infectés avec ou sans SCMV et il n'y a pas eu une coloration plus intense des faisceaux en bleu (traduisant la présence de SCYLV). De plus, les particules de SCYLV sont restées localisées dans les tissus du phloème de la nervure des feuilles et le SCMV a été normalement mis en évidence dans tous les tissus de la nervure foliaire. Au niveau des symptômes, les jaunissements sont apparus très tôt (un mois après la mise en place de l'essai) sur les deux cultivars aussi bien sur les plantes infectées uniquement par le SCYLV que sur les plantes infectées par les deux virus. Il ne semble donc pas y avoir eu une intensification des symptômes de jaunissement suite à la présence du SCMV. Les symptômes de mosaïque ont été assez sévères et sont apparus sur toutes les plantes dix jours après l'inoculation du SCMV.

5. Discussion et conclusion

L'étude de l'impact du SCYLV sur le rendement devait initialement être réalisée à l'aide de vitroplants non virosés et de vitroplants infectés par le SCYLV. Malheureusement, cela n'a pas été possible car, pour des raisons techniques, la quantité de vitroplants produite était insuffisante à la période prévue pour la plantation de l'essai. Comme nous souhaitions mettre en place cet essai pendant la période habituelle de plantation de la canne à sucre sur l'île, les vitroplants ont dû être remplacés par des boutures issues de tiges saines ou infectées prises directement dans les parcelles de production après un diagnostic par IE. La plantation de vitroplants aurait permis de mieux s'assurer de l'état sanitaire du matériel végétal (culture de tissus et diagnostic par RT-PCR) et d'avoir des plantes à croissance plus homogène. En revanche, la plantation de boutures a permis de nous placer davantage dans les conditions réelles de culture.

La prospection de tiges saines et infectées pour l'étude de l'impact du SCYLV sur le rendement a permis d'identifier le matériel végétal approprié à la plantation, mais elle a aussi apporté des informations complémentaires concernant le pourcentage d'infection des cultivars selon les sites de prélèvement. En effet, le pourcentage d'infection du cultivar R570 était de 99% à la station de Saint-Benoît mais seulement de 53% à la station de La Mare. Les autres cultivars (R575, R577 et R579) ont été prospectés sur un seul site, et les taux d'infection ont varié en fonction du cultivar : 99% (R575), 10% (R577) et 62% (R579). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors du suivi des taux d'infection pendant une période de 30 mois sur plusieurs sites (Chapitre 2).

Le cultivar R575 n'a pas été planté dans l'essai car, lors de la prospection, la période de récolte était déjà commencée. Ce cultivar étant une canne de début de campagne (c'est-à-dire qu'elle est mature plus tôt que les deux autres cultivars et donc récoltée au début de la campagne sucrière), il ne restait pas assez de parcelles de R575 à notre disposition. De plus, à Saint-Benoît, 99% des tiges étaient infectées alors que 50% de tiges saines et 50% de tiges virosées étaient nécessaires pour la mise en place de l'essai. Enfin, nous avons dû décaler la plantation de trois mois (mois de novembre au lieu du mois d'août) à cause d'un problème d'irrigation sur la station accueillant l'essai. Même si nous avions eu à notre disposition des boutures de R575, elles auraient été trop âgées au moment de la plantation, et le pourcentage de germination aurait été trop faible. En prévision de ce problème, le cultivar R577 a été rajouté à la prospection afin de remplacer le cultivar R575 lors de la mise en place de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre".

Dix pour cent des boutures testées saines lors de la plantation ont abouti à la formation de tiges porteuses du virus avant la récolte. Ce résultat peut être dû soit à des infections par les pucerons, soit à la non-détection du SCYLV dans le matériel de plantation. La seconde hypothèse semble plus probable car les plantes étaient régulièrement traitées contre les pucerons avec trois matières actives appliquées en rotation, visant à éviter le développement de populations résistantes. La lutte chimique contre les insectes vecteurs circulants persistants (cas des pucerons vecteurs des *Luteoviridae*) s'avère relativement efficace, du moins pour prévenir les contaminations secondaires (Chapitre 3), car la capacité de transmission est souvent liée à la durée d'acquisition. En effet, plus celle-ci est prolongée, meilleure est la transmission du virus par l'insecte (Gildow, 1999).

Deux techniques de détection du SCYLV ont été mises au point : l'IE (Schenck *et al.*, 1997) et la RT-PCR (Comstock *et al.*, 1998). Néanmoins, quelle que soit la technique de détection utilisée, celle-ci a un seuil limite de détection. Il est donc possible que, dans certains cas, les populations virales étaient inférieures à ce seuil. La RT-PCR (technique de biologie moléculaire) permet en général de détecter des populations virales plus faibles que l'IE (technique immunologique). Il était cependant impossible de détecter le virus par RT-PCR au cours de notre étude étant donné le grand nombre d'échantillons à tester. Par ailleurs, les méthodes de biologie moléculaire sont plus longues à réaliser, et surtout très onéreuses. De plus, plusieurs équipes ont montré qu'il existait une excellente corrélation entre les résultats obtenus par biologie moléculaire et ceux obtenus par immunologie (Chatenet *et al.*, 2001 ; Delage, 1998 ; Rassaby *et al.*, 1999).

Lors de l'étude de la dynamique virale dans la plante (Chapitre 2), il a été montré que lorsque l'on plantait des boutures infectées par le SCYLV, la tige primaire ainsi que l'ensemble des tiges produites par la bouture étaient également colonisées par le virus. Or, dans notre essai, nous avons remarqué que, dans la plupart des cas, lorsqu'une tige était porteuse du virus, les autres tiges d'une même touffe étaient également infectées. Etant donné que le virus a été détecté dans plusieurs tiges d'une même touffe, on peut supposer que le SCYLV était bien présent dans

la bouture au moment de la plantation mais qu'il n'y a pas été détecté par la technique d'IE à cause d'une charge virale trop faible. De même, lorsqu'une tige primaire était indemne de virus, les tiges secondaires, tertiaires ou quaternaires l'étaient également. Si nous avions constaté qu'une seule tige sur les cinq testées étaient virosée, l'hypothèse d'une contamination par les pucerons aurait été plus probable.

Par ailleurs, au moment de la plantation, nous avons considéré que l'ensemble de la plante était infectée quand la feuille F1 était positive en IE. Ce postulat n'est apparemment pas toujours valable. En effet, des chercheurs du CIRAD en Guadeloupe ont récemment montré que la répartition du virus *in planta* est généralement systémique mais que le virus est parfois détecté dans les feuilles et pas dans les tiges, et *vice versa* (Daugrois *et al.*, 2000). Ce phénomène a également été observé en serre de quarantaine à Montpellier où, pour optimiser le diagnostic, plusieurs tests (RT-PCR et IE) sont réalisés à différents stades de croissance sur différents organes de la plante (Chatenet, communication orale). A Maurice, il a été montré que la concentration virale était plus élevée dans la partie supérieure des tiges que dans la partie inférieure (Moutia et Saumtally, 2001). Cette répartition inégale du virus dans certaines plantes pourrait aussi être à l'origine, dans notre essai, des tiges infectées issues de boutures "saines".

Quelques boutures issues de plantes malades ont aussi conduit au développement de tiges saines, mais en faible quantité (1,6%). Ce phénomène pourrait également être expliqué par la répartition inégale du virus dans la plante d'origine. Néanmoins, on ne peut exclure l'hypothèse d'un assainissement naturel lors du débourrement car la culture de bourgeons permet d'aboutir jusqu'à 30% de plantes indemnes de virus (Chatenet *et al.*, 2001 ; Delage, 1998). Ce résultat pourrait être dû à la répartition et la connexion des faisceaux vasculaires des tiges aux bourgeons latéraux. En effet, malgré une répartition systémique du SCYLV dans la plante, tous les faisceaux du phloème ne sont peut-être pas forcément colonisés par le virus au niveau de la tige. On peut supposer que certains bourgeons latéraux ne seraient pas alimentées par des faisceaux infectés par le SCYLV. De ce fait, en germant, ces bourgeons pourraient conduire à la formation de plantes saines alors qu'ils provenaient de boutures infectées.

Finalement, même si elle est peu probable vu les traitements insecticides appliqués et la répartition du virus au sein d'une même touffe, une contamination par les insectes vecteurs ne peut être exclue. Cependant, une première vérification de l'état sanitaire des tiges de canne à sucre a été faite trois mois après la germination des boutures et il était identique à celui observé à la récolte (Figure 11). S'il y a bien eu infection par des pucerons, celle-ci a eu lieu dès les premiers stades de croissance et la fenêtre de contamination de la canne à sucre serait alors réduite. Ce phénomène de fenêtre réduite pour l'infection virale a été observé en Afrique du Sud pour la mosaïque de la canne à sucre (Bailey et Fox, 1980). Dans ce pays, la période de plantation a lieu à la fin de l'été jusqu'au début de l'automne et cette période coïncide avec la période de vol des pucerons. Une lutte efficace contre la mosaïque a pu être mise en place en Afrique du Sud en décalant la période de plantation des clones sensibles. On peut penser que le stade jeune plante (moins de 12 semaines après la plantation) serait le stade idéal d'infection par les insectes de type piqueurs-suceurs car il serait plus adéquat à la prise de nourriture (de part la composition de la sève très riche en acides aminés et en glucides). Il a été montré que les pucerons étaient en général influencés par la physiologie de la plante hôte. Lorsqu'il y a des changements physiologiques liés à la formation de graines par exemple, des transferts de glucides et d'acides aminés ont lieu au profit des graines et cela est corrélé à une régression des populations de pucerons (Bouchery, 1977). D'autres chercheurs ayant travaillé sur le choix de l'hôte par le puceron pensent plutôt que les pucerons sont attirés par des plantes isolées car, dans les airs, les pucerons sont incapables de reconnaître leurs plantes hôte. Ils se repèrent au reflet du sol et au contraste des plantes isolées sur celui-ci (Klingauf, 1987). Ce n'est qu'une fois sur la plante que le

puceron va faire des piqûres d'essai pour savoir si l'hôte lui convient et s'il décide de s'y installer. Cette hypothèse peut être valable sur canne à sucre ; en effet, cette plante est cultivée sur des surfaces très vastes et ce n'est qu'au bout de quatre mois, lorsque le tallage est terminée, que le sol est entièrement recouvert. Vu du ciel, on observe alors de grandes étendues de feuilles formant une canopée très dense. Le puceron a donc plus de chance de se poser sur une canne à sucre avant le début du tallage, ce qui expliquerait la fenêtre réduite de contamination (de la plantation jusqu'à quatre mois).

Une perte de rendement en tonnage de canne à sucre et de richesse en sucre a été mise en évidence dès le premier cycle de récolte pour le cultivar R577 : baisse significative de diverses composantes du rendement et de la richesse en sucre de tiges virosées par rapport à des tiges saines. En revanche, pour les deux autres cultivars (R570 et R579), la présence du SCYLV n'a pas eu d'effets détectable sur le rendement et sur la richesse en sucres. Le cultivar R577 n'est habituellement pas planté dans la zone où l'essai a été mis en place et, de ce fait, l'hypothèse d'une mauvaise croissance due à des conditions environnementales inadaptées et exacerbée par la présence d'un agent pathogène pourrait être envisagée. Cependant, les paramètres mesurés sur les tiges infectées par le SCYLV ont été comparés aux paramètres mesurés sur les témoins sains, et, par ailleurs, le rendement des plantes saines du cultivar R577 était supérieur à celui du cultivar R570 (cultivar le plus cultivé à La Réunion). Il existe donc bien une différence variétale face à l'infection du SCYLV et ce résultat est similaire aux résultats de travaux précédents sur l'impact des *Luteoviridae* ; en effet, il a été démontré que les virus de cette famille (PLRV/pomme de terre, BYDV/orge) pouvaient provoquer des pertes de rendements importantes, et qu'il y avait des différences variétales marquées (Loughnane, 1941 ; Smith et Hallsworth, 1990).

Il est intéressant de noter que lorsque le cultivar R577 est cultivé dans des parcelles de production, ses taux d'infection par le SCYLV sont faibles (10%), contrairement aux deux autres cultivars (Tableau 1). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène. Le cultivar R577 n'est cultivé que dans une zone géographique bien déterminée : région sèche, zone non irriguée à des altitudes moyennes à hautes de l'Ouest jusqu'au Sud. Ainsi, un brassage moins important du matériel contaminé pourrait être à l'origine des faibles taux d'infection du cultivar R577 à La Réunion. Mais l'hypothèse d'une résistance aux insectes vecteurs ne doit pas être écartée.

Un essai identique a été mené en Louisiane sur trois cycles de récolte avec le cultivar LCP 82-89 sensible au YLS (Grisham *et al.*, 2000). Des pertes de rendement en sucres de 6%, 11% et 14% ont été démontrées respectivement en canne plantée, première et seconde repousse. La qualité de jus (Brix, Pol, fibres, pureté) n'a pas été affectée mais le nombre de tiges par touffe ainsi que le tonnage étaient réduits. Un impact significatif du SCYLV sur le rendement a également été mis en évidence sur un cultivar de la Réunion (R577) mais les paramètres étaient parfois différents. Ainsi, à La Réunion, le nombre de tiges par touffe n'a pas été réduit quand le SCYLV était présent mais la hauteur, le diamètre et le poids des tiges virosées ont été bien plus faibles que chez les témoins sains. De plus, les valeurs de Brix et de Pol ont également chuté au contraire de la pureté du jus qui est restée stable. Ce phénomène de perte de la quantité, mais pas de qualité de la production, avait déjà été observé pour d'autres plantes infectées par des virus de la famille des *Luteoviridae*. Par exemple, le nombre de fleurs et de fruits produits par une plante infectée par le CABYV est considérablement réduit, mais la qualité des fruits n'est pas modifiée (Lecoq *et al.*, 1992). Etant donné la baisse progressive du taux de sucre dans les cannes à sucre infectées selon le cycle de récolte en Louisiane, on peut s'attendre à une perte plus significative lors de la prochaine récolte de l'essai "impact du SCYLV sur la canne à sucre" à La Réunion.

Aucun symptôme de YLS n'était visible pendant les neuf premiers mois de croissance des plantes au champ. Ce phénomène peut être considéré comme étant tout à fait normal car on sait que les symptômes n'apparaissent et/ou sont plus sévères qu'à la maturité des tiges ou à la suite de stress environnementaux (Comstock *et al.*, 1994 ; Shenck *et al.*, 1997). Ce n'est qu'une fois le sevrage effectué (arrêt de l'irrigation six semaines avant la récolte) que les premiers jaunissements ont été observés à La Réunion. Le développement de ces symptômes a donc coïncidé avec la période de maturation des tiges provoquée par le sevrage qui est aussi à l'origine de la présence de jaunissements sur des plantes saines. Des symptômes de jaunissements peuvent par ailleurs être dus à des causes diverses comme une déficience ou un excès en nutriments ou en sels minéraux (Borth *et al.*, 1994), une initiation florale, une attaque de foreurs, l'approche de la maturité (Matsuoka et Meneghin, 1999), l'entrée en saison froide ou un excès d'eau (Comstock *et al.*, 1994). Malgré le caractère aspécifique de ces symptômes, un certain nombre de jaunissements foliaires sont liés à la présence du SCYLV dans la plante, surtout pour les cultivars sensibles à la maladie. Une fois de plus, le cultivar R577 diffère des deux autres cultivars car il présente des jaunissements plus fréquents et plus sévères. Néanmoins, d'une manière générale, la présence de SCYLV est liée à l'apparition de jaunissements foliaires plus intenses que ceux dus à des stress environnementaux ou à la maturité. Il est aussi important de garder à l'esprit que l'absence de symptômes ne signifie pas forcément absence d'organismes phytopathogènes. Beaucoup de plantes infectées par des agents pathogènes ne présentent pas de symptômes ou de façon si discrète qu'ils échappent à l'observation visuelle pendant une longue période (phase de latence). Ce phénomène a notamment été mis en évidence pour le flétrissement bactérien sur tomate (Prior *et al.*, 1990) ou encore pour l'échaudure des feuilles de la canne à sucre (Rott *et al.*, 1988). Pour cette dernière maladie, la phase de latence est rompue pour des raisons encore inconnues, mais l'explication la plus couramment invoquée fait état de stress environnementaux qui favoriseraient le développement de la maladie. Pour le MSV (*Maize streak virus*), il a été montré que plus les symptômes étaient sévères, plus la concentration en particules virales était élevée (Peterschmitt, 1988). Ces hypothèses pourraient aussi être émises pour le YLS, mais restent à être vérifiées.

L'expérience de co-infection entre le SCYLV et le SCMV semble démontrer que les particules de SCYLV ne sont pas perturbées quand elles sont mises en présence du SCMV. Ce résultat est contraire à d'autres situations existant dans la nature où l'association d'un virus de la famille des *Potyviridae* avec un virus de la famille des *Luteoviridae* augmente considérablement la charge virale du *Luteoviridae*. Sur melon par exemple, le ZYMV (*Potyviridae*) augmente la concentration du CABYV (*Luteoviridae*) lorsqu'ils sont présents de façon simultanée dans la plante, avec un pic maximum de particules virales à trois semaines après la co-infection (Bourdin et Lecoq, 1994). Des essais conduits sur d'autres *Cucurbitaceae* infectées par le CABYV et d'autres virus de la famille des *Potyviridae* ont montré une augmentation similaire des particules virales du CABYV. Outre l'augmentation de la charge virale, une modification de l'expression des symptômes peut aussi et lors des expériences de co-infection, les symptômes sont en général plus sévères (Barker, 1989). Ce phénomène n'a pas non plus été observé dans la cadre de nos travaux. Les symptômes de YLS sont apparus un mois après la co-infection sur les deux cultivars ainsi que sur les plantes témoins avec SCYLV seul, mais ils n'ont pas été plus sévères. On notera l'apparition précoce (moins de deux mois) de jaunissements foliaires sur les cultivars H32-8560 et H50-7209 cultivés en serre, contrairement à ceux cultivés en serre ou en champ à La Réunion. Cette situation est peut-être liée à la présence d'isolats différents de SCYLV (Chapitre 4). D'autres travaux ont montré que le PLRV pouvait envahir des tissus non phloémiens lorsqu'il est en présence de *Potyviridae* (Barker, 1987). Cela n'a pas été mis en évidence avec le SCYLV et le SCMV, le SCYLV ayant toujours été localisé dans les faisceaux de phloème. De ce fait, même si nous n'avons pas vérifié la transmission du SCYLV après la co-infection, il semble peu probable que le SCYLV ait pu être transmis mécaniquement comme cela a été montré avec le BWYV

infecté avec le *Lettuce speckles mottle virus* (Falk *et al.*, 1979). Les études de co-infection du CABYV et des *Potyviridae* sur *Cucurbitaceae* (Bourdin et Lecoq, 1994) ont aussi montré que certains couples de virus n'avaient pas d'influence sur les concentrations du CABYV comme le CMV (*Cucumber mosaic virus*) et le SqMV (*Squash mosaic virus*) et que la plante hôte pouvait avoir une influence. En effet, la présence du ZYFV (*Zucchini yellow fleck virus*) conduit à l'augmentation du nombre de particules de CABYV sur concombre mais n'a pas d'effet sur les particules de CABYV sur courgette. Ce type d'interaction pourrait également être observé avec différents hôtes du SCYLV mais dans la nature, la canne à sucre est à ce jour la seule plante hôte du SCYLV (Schenck et Lehrer, 2000). Le SCMV n'a plus été observé à La Réunion depuis de nombreuses années (Girard et Payet, 1997), mais les agents causals de la mosaïque et du syndrome de la feuille jaune coexistent (Rott *et al.*, 2000) et sont largement répandus dans plusieurs zones de production sucrière (Floride, Louisiane, Pérou, Australie....). De nombreuses souches de SCMV ont été caractérisées et le SCYLV est également un virus relativement variable (Chapitre 4). Des études complémentaires sont donc à envisager pour déterminer si, lorsque ces deux espèces virales sont en présence, les concentrations virales augmentent, la transmission du SCYLV est modifiée ou les dégâts causés sont plus graves.

III. CHAPITRE 2 : DYNAMIQUE VIRALE

1. Introduction

Si le YLS ne s'était pas manifesté sur la principale variété commerciale du Brésil, il n'aurait peut-être pas encore été découvert aujourd'hui en raison d'une symptomatologie aspécifique. Cependant vu la large répartition du virus dans le monde, il ne fait aucun doute que ce n'est pas une maladie émergente. D'ailleurs, la première description de la maladie daterait de 1968 si l'on considère que le Yellow wilt et le YLS constituent la même maladie (Lockhart et Cronjé, 2000 ; Ricaud, 1968).

En ce qui concerne La Réunion, l'enquête phytosanitaire réalisée en 1998 a permis de montrer une répartition du SCYLV sur toute l'île et sa présence dans trois principaux cultivars : R570, R575 et R579 (Rassaby *et al.*, 1999). Les taux de contamination variaient de 10 à 100% selon les lieux et les cultivars. Une hypothèse de différence variétale a été proposée mais ce résultat correspondait à une observation à un temps donnée. Afin d'analyser la représentation de cette situation et de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de suivre les taux d'infection dans le temps. Un suivi a été effectué deux fois par an sur une période de 30 mois et sur trois cycles de récolte. Trois sites ont été retenus sur les huit sites ayant fait l'objet de l'enquête phytosanitaire en 1998. Les raisons de ce choix sont les suivantes : conditions de cultures différentes (champs de sociétés et champs d'expérimentation du CERF), taux d'infection variables (champs très infectés et peu infectés), conditions climatiques différentes (sec, très sec et humide).

Les *Luteoviridae* ont une répartition systémique dans la plante à travers les faisceaux du phloème (Smith et Barker, 1999). Or, il a été démontré en Guadeloupe (Daugrois *et al.*, 2000) ou en serre à Montpellier (Chatenet, communication orale) que ce phénomène n'était pas toujours vérifié. En effet, un test sur feuilles de canne à sucre peut quelquefois être négatif alors que le même test sur la tige est positif et *vice-versa*. Au début de ces travaux sur le YLS, aucune donnée concernant la dynamique virale du SCYLV dans la plante hôte n'était disponible. Des essais ont donc été réalisés en serre étanche aux insectes pour étudier la répartition du virus dans la plante et dans le temps avec divers cultivars depuis la germination des boutures plantées jusqu'à la formation de tiges matures. Deux types d'essais ont été conduits selon des modalités de prélèvement différents. Tout d'abord, un essai avec prélèvement destructif (répété une fois à deux mois d'intervalle) avec les cultivars R570, R577 et R579. Le cultivar R575 a été remplacé par le cultivar R577 pour les mêmes raisons qu'indiquées au chapitre 1 : lors de la mise en place de l'essai, la période de récolte était déjà commencée ; ce cultivar étant une canne de début de campagne (c'est à dire qu'elle est mature et donc récoltée plus tôt que les deux autres cultivars), il ne restait pas assez de parcelles de R575 à notre disposition. De plus, même si nous avions eu à notre disposition des boutures de R575, elles auraient été trop âgées pour la plantation, et le pourcentage de germination aurait été trop faible. Le second type d'essai, à prélèvement non destructif, a été mis en place plus tard avec les cultivars R570, R575, R577 et R579.

2. Dynamique des virus dans les plantes

Les phytovirus n'ont pas la capacité intrinsèque de traverser la cuticule des plantes pour pénétrer dans les tissus de l'hôte. La transmission fait donc appel à des stratégies performantes utilisant par exemples le passage par les semences, par les blessures ou par des vecteurs (Semal, 1989).

Une fois le virus dans la plante, on observe une première étape de multiplication appelée phase initiale de multiplication. Celle-ci est suivie d'un déplacement vers les cellules voisines *via*

les plasmodesmes appelé mouvement de "cellule à cellule" ou mouvement courte distance (Lazarowitz et Beachy, 1999). Puis, un mouvement dit "longue distance" et plus rapide *via* les tissus vasculaires peut avoir lieu en fonction du virus impliqué.

2.1. Mouvement courte distance

Depuis 1948, on suspecte que les phytopathogènes se déplacent d'une cellule à l'autre *via* les plasmodesmes (Ding *et al.*, 1992). Mais, selon l'âge de la plante, on distingue deux types de structure de plasmodesmes dans les cellules du mésophylle : les plasmodesmes primaires dans les tissus jeunes et les plasmodesmes secondaires dans les tissus plus âgés. Entre le desmotubule (complexe membranaire protéique constituant le plasmodesme) et le plasmalemme, il existe une cavité centrale dont le diamètre varie jusqu'à une taille limite d'exclusion (TLE). La structure des plasmodesmes et la TLE sont des éléments déterminants dans le mouvement du virus dans la plante. Cependant, des protéines structurales comme la protéine de capsid (CP), ou des protéines non-structurales comme la protéine de mouvement (MP) permettent le passage de virus à diamètre important à travers des plasmodesmes en augmentant les TLE (Cruz *et al.*, 1998).

Dans la majorité des cas, il y a une seule MP qui assure la fonction de mouvement (cas des *Luteovirus*). Dans d'autre cas, ces fonctions sont partagées par deux MP : ainsi pour certains *Geminivirus*, virus à ADN simple brin qui se répliquent dans le noyau, une protéine assure le transport du matériel infectieux depuis le noyau vers le cytoplasme *via* les pores nucléaires, puis une autre protéine assure le transport jusqu'à la périphérie de la cellule et *via* les plasmodesmes de la cellule adjacente. Dans le cas des *Tombusvirus*, il y a également deux MP, l'une responsable du mouvement de cellule à cellule et l'autre responsable du mouvement longue distance. Dans d'autres cas encore, la fonction de mouvement est codée par trois MP : c'est le cas du groupe des trois gènes appelés "triple gene block" des *Furo*, *Potex*, *Hordei* et *Carlavirus*. Pour les *Necrovirus*, il y aurait deux ou trois petits cadres ouverts de lecture (ORF) codant pour deux ou trois MP. Enfin, les *Potyvirus* font exception car apparemment ils n'ont pas de MP attitrée. En plus de la/des MP, d'autres protéines virales structurales ou non structurales peuvent être associées au mouvement de cellule à cellule comme la protéine de capsid (CP) de certaines familles de virus.

Selon les groupes de virus, trois modèles de déplacements ont été étudiés (Lazarowitz et Beachy, 1999 ; Stussi-Garand *et al.*, 1998) :

- Premier modèle valable pour les *Tobamo*-, *Diantho*-, *Tobra*-, *Tymo*-, *Tombus*- et *Furovirus* et qui a été démontré avec le TMV (*Tobacco mosaic virus*). On observe le déplacement du virus de cellule à cellule par les plasmodesmes sous forme d'un complexe associant la MP et l'ARN viral sans intervention de leur CP.
- Second modèle pour les *Gemini*-, *Potex*- et *Alphamovirus*. Il implique, en plus de la ou des MP, la présence de la CP pour assurer le passage du matériel infectieux sous forme d'un complexe MP/ARN/CP. Néanmoins, l'encapsidation du génome n'est pas requise.
- Troisième modèle valable pour les *Caulimo*-, *Nepo*-, *Luteo*-, *Cucumo*-, *Como*- et *Bromovirus*. Le passage du virus d'une cellule à une autre à travers les plasmodesmes *via* des tubules stables est réalisé sous forme de virions par encapsidation du virus. Ce phénomène fait intervenir la CP et la MP.

2.2. Mouvement longue distance

D'une façon générale, une fois le virus présent dans les faisceaux vasculaires, l'infection devient systémique. Les modèles attribuant à certains isolats un mouvement vasculaire limité dans certains cultivars suggèrent que la zone située entre la gaine vasculaire et le phloème pourrait être, au moins en partie, une barrière responsable de cette limitation (Ding *et al.*, 1998). C'est le cas pour le TEV (*Tomato etch virus*) pour lequel une barrière se forme au niveau des cellules compagnes et des tubes criblés (Schaad *et al.*, 1996). On parle également de résistance au mouvement.

2.3. Résistance d'une plante au mouvement des particules virales

La résistance (mono- ou polygénique) aux phytovirus peut être contrôlée par des gènes de façon dominante ou récessive. Dans un concept gène pour gène, le produit d'un gène unique de la plante (gène de résistance) interagit avec le produit du gène d'avirulence du virus pour donner une réaction d'hypersensibilité appelée HR (Flor, 1955). On peut cependant se demander si la résistance de la plante se situe au niveau de la multiplication ou au niveau du mouvement des virus. Plusieurs cycles viraux ont été étudiés dans différents organes de la plante pour essayer de répondre à cette question, comme par exemple le site d'inoculation par rapport aux sites infectés systématiquement. Lorsque la réplication virale a lieu au point d'inoculation ou dans la feuille inoculée, mais qu'aucun autre organe n'est infecté, on parle à une résistance au mouvement. Cette hypothèse est renforcée lorsque le virus se réplique à un taux important dans des protoplastes de plantes résistantes (Njeru *et al.*, 1995). En revanche, si le virus ne se réplique que peu ou pas du tout au site d'inoculation ou dans la plante, on parle de résistance à la multiplication. Cette résistance est aussi associée à un faible taux de réplication virale dans des protoplastes isolés. La distinction entre ces deux types de résistance n'est cependant pas toujours aussi tranchée, pour deux raisons : 1/ la réplication et le mouvement du virus de cellule à cellule font intervenir la machinerie de la plante et, de ce fait, le rythme de développement et l'état physiologique de la plante interviennent dans le processus, et 2/ la réplication virale dans les protoplastes n'est qu'indicatrice de la résistance, car l'expression du gène de résistance peut être différente dans des cellules isolées et dans les cellules intégrées à une structure tissulaire.

Chez les génotypes de riz partiellement résistants au RYMV (*Rice yellow mottle virus*), une absence de particules virales dans les tissus de la gaine périvasculaire a été observée au début et aux stades intermédiaires de l'infection (Ioannidou *et al.*, 2000). En revanche, le virus a été détecté dans ces tissus lors de la dernière phase de l'infection. Le mouvement a donc été retardé mais pas aboli, et ces plantes bénéficient d'un délai d'accès du virus à l'ensemble des tissus foliaires. Au stade final, les concentrations virales dans ces génotypes sont égales à celles de cultivars sensibles. Cependant, ces génotypes partiellement résistants ou tolérants peuvent supporter cette charge virale élevée sans manifester de symptômes sévères, ni de nécroses, contrairement aux cultivars sensibles.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel

Le suivi des taux d'infection au champ et l'étude de la répartition du SCYLV dans la feuille ont été effectués à l'aide de cannes à sucre provenant de champs commerciaux et expérimentaux. Quatre parcelles situées sur trois sites ont été choisies : La Mare, Saint-Benoît (parcelle I et II) et Savanna. Les stations de La Mare et celle de Saint-Benoît sont deux sites expérimentaux appartenant au CERF et le site de Savanna appartient à une société privée. Deux

prélèvements par cycle de récolte ont été effectués sur trois cultivars (R570, R575 et R579) pendant 30 mois (de juillet 1998 à janvier 2001) : tiges jeunes (5 mois) et tiges matures (10 mois). A chaque prélèvement, 100 feuilles F1 (feuilles prélevées sur des touffes différentes dans la mesure du possible) ont été récoltées au hasard par parcelle et par cultivar sur une superficie de 50 m².

Les travaux sur la dynamique virale au sein d'une plante hôte ont été réalisés avec les cultivars R570, R577 et R579 pour les essais avec destruction des plantes (lors des analyses) et les cultivars R570, R575, R577 et R579 pour l'essai sans destruction des plantes. Les plantes étaient cultivées dans une serre étanche aux insectes où des boutures issues de parcelles de production avaient été plantées.

Lors de la première enquête phytosanitaire réalisée en 1998, les cannes à sucre n'avaient pas toutes le même âge puisque tous les champs n'avaient pas été plantés ou récoltés en même temps. R575 est une canne de début de campagne et elle atteint la maturité avant les deux autres cultivars (R570 et R579). La date de récolte pour ces trois cultivars est donc différente. C'est pourquoi les prélèvements qui ont suivi cette enquête n'ont pas été faits en même temps mais en fonction de l'âge de la plante.

3.2. Méthodes

3.2.1. Culture des plantes en serre

Un premier essai de dynamique virale, avec prélèvement destructif, a été mis en place en serre étanche aux insectes. Il était constitué de 35 boutures virosées et sept boutures saines pour chacun des trois cultivars R570, R577 et R579. La présence du SCYLV dans chaque bouture a été vérifiée par IE avant leur plantation individuelle dans des pots de sept litres contenant un mélange de terreau (1/3), de gravier (1/3) et de terre (1/3). Les plantes ont été irriguées par aspersion. Cet essai a été répété une fois à deux mois d'intervalle.

Un second essai de dynamique virale, avec prélèvement non destructif, a également été mis en place en serre étanche aux insectes, de la même façon que précédemment, avec les cultivars R570, R575, R577 et R579. Il était constitué de 20 plantes virosées et cinq plantes saines par cultivar (Photo 11).

3.2.2. Détection du SCYLV

3.2.2.1. Au champ

La détection du virus au champ a été réalisée par IE (Chapitre 1) sur membrane de nitrocellulose. Les empreintes ont été réalisées à l'aide de la nervure centrale des feuilles F1 (première feuille déroulée avec ochréa visible au sommet de la tige).

3.2.2.2. En serre

Pour les essais avec prélèvement destructif, cinq plantes infectées et un témoin sain de chaque cultivar ont été prélevés tous les mois pour rechercher la présence du SCYLV dans différents organes de la plante : toutes les feuilles (base de la nervure centrale), toutes les tiges (haut, milieu et bas), et l'ensemble du système racinaire. La technique d'IE sur membrane de nitrocellulose a été utilisée pour détecter le virus dans les parties aériennes de la plante. En revanche, la technique RT-PCR a été utilisée pour les racines car celle-ci n'étaient pas assez rigides pour permettre de réaliser des empreintes.

Pour l'essai avec prélèvement non destructif, les analyses ont été réalisées sur les feuilles F1, d'abord par RT-PCR tous les 15 jours pendant les deux premiers mois de croissance, puis par IE pendant neuf mois à raison d'une fois par mois. Après neuf mois de croissance, les tiges et les racines ont également été analysés par RT-PCR, en effectuant des carottages en section transversale à l'aide d'un perce-bouchon de 5 mm de diamètre dans la région médiane de la tige et à travers le milieu du pot pour les racines.

3.2.3. Détection du SCYLV par RT-PCR

3.2.3.1. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN total a été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plant (QIAGEN) qui comporte un ensemble de colonnes à centrifuger (RNeasy®, QIAshredder™) et des tampons de lyse (RTL) et de lavage (RW1, RPE).

L'ARN total a été extrait à partir de 100 mg de feuille (extrémité du limbe et de la nervure) ou de racines qui on été broyés dans des mortiers contenant de l'azote liquide. A ce broyat ont été ajoutés 450 µl de tampon de lyse RLT contenant du β-mercaptoproéthanol (10 µl/ml). Les lysats obtenus ont été centrifugés à travers une colonne QIAshredder™ afin d'éliminer les déchets végétaux. Puis, 225 µl d'éthanol froid (96-100%) ont été ensuite ajoutés au produit de centrifugation. Ce mélange a été introduit et centrifugé dans une nouvelle colonne contenant une membrane de silicagel fixant l'ARN. Après des lavages avec 500 µl de tampons RW1 et RPE, l'ARN a été élue avec 40 µl d'eau garantie sans RNase.

3.2.3.2. RT-PCR

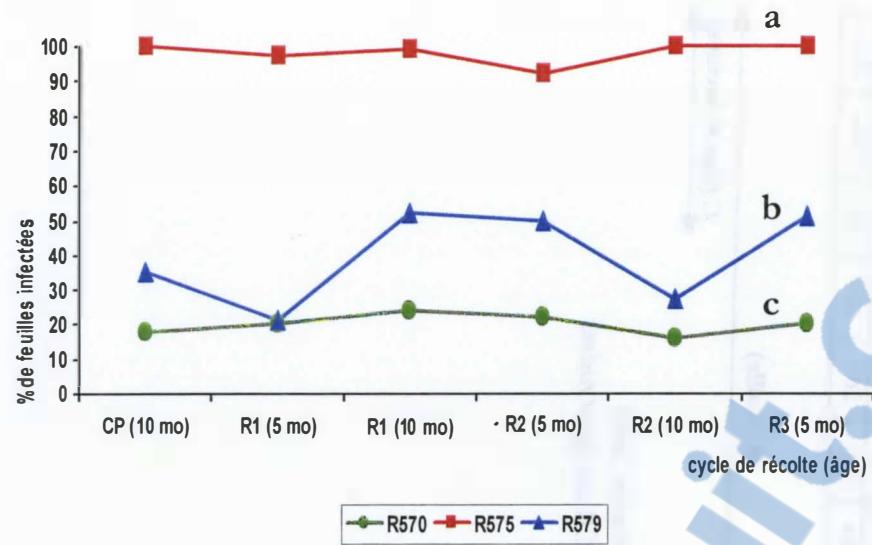
Tous les produits utilisés lors de cette étape étaient des produits Perkin Elmer. Pour un échantillon, 0,25 µl d'amorce YLS462 à 60 µM (Comstock *et al.*, 1998 ; Irey, communication personnelle) a été dilué dans 0,25 µl d'eau sans RNase ; 1 µl d'ARN extrait a été ajouté et le tout a été mis à bouillir pendant 5 minutes. Après avoir été remis dans de la glace pendant 5 minutes, le mélange a été centrifugé quelques secondes et 8,5 µl du mélange suivant y ont été ajouté : 0,25 µl de MgCl₂ à 25 mM, 1 µl de tampon PCR 10X, 1 µl de chaque dNTP à 10 mM, 0,5 µl d'eau sans RNase (QIAGEN), 0,5 µl de inhibiteur de RNase à 20 U/µl, et 0,5 µl de transcriptase reverse MuLv à 50 U/µl. Après avoir bien homogénéisé le mélange de 10 µl, les tubes ont été déposés dans un thermocycleur pour la rétrotranscription avec un cycle de 15 minutes à 42°C, 5 minutes à 99°C.

Le produit de la RT-PCR a ensuite été additionné de 40 µl du mélange PCR contenant 4 µl de MgCl₂ à 25 mM, 4 µl de tampon PCR, 31,5 µl d'eau sans RNase, 0,25 µl de Taq polymérase à 5 U/µl, et 0,25 µl d'amorce YLS111 à 60 µM (Comstock *et al.*, 1998 ; Irey, communication personnelle). Une goutte d'huile minérale a été ajoutée et les tubes ont été placés dans le thermocycleur avec les cycles suivants : 1 minute à 94°C, 1 minute à 54°C, 3 minutes jusqu'à 72°C, 20 minutes à 72°C pendant 1 cycle, puis 1 minute à 94°C, 1 minute à 54°C, 3 minutes jusqu'à 72°C et 2 minutes à 72°C pendant 40 cycles, 10 minutes à 72°C et le tout a été maintenu à 4°C jusqu'à la visualisation du produit d'amplification par électrophorèse.

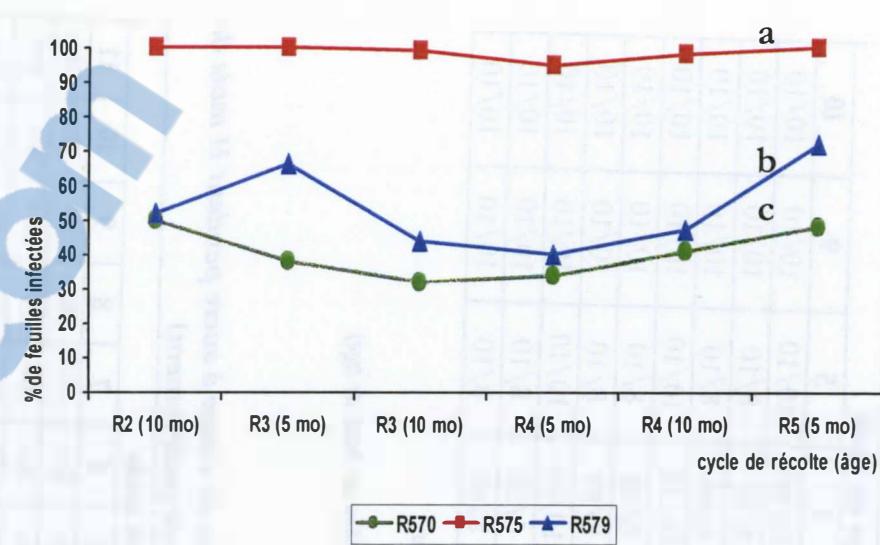
3.2.3.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse

L'ADN amplifié a été mis à migrer dans un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE (0,90 M de Tris Base, 0,90 M d'acide borique et 0,20 M d'EDTA en solution). Dans chaque puits

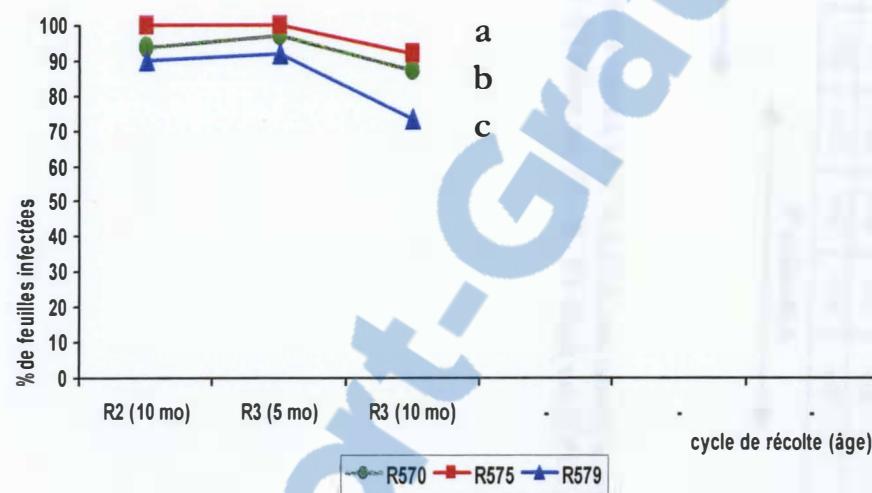
La Mare



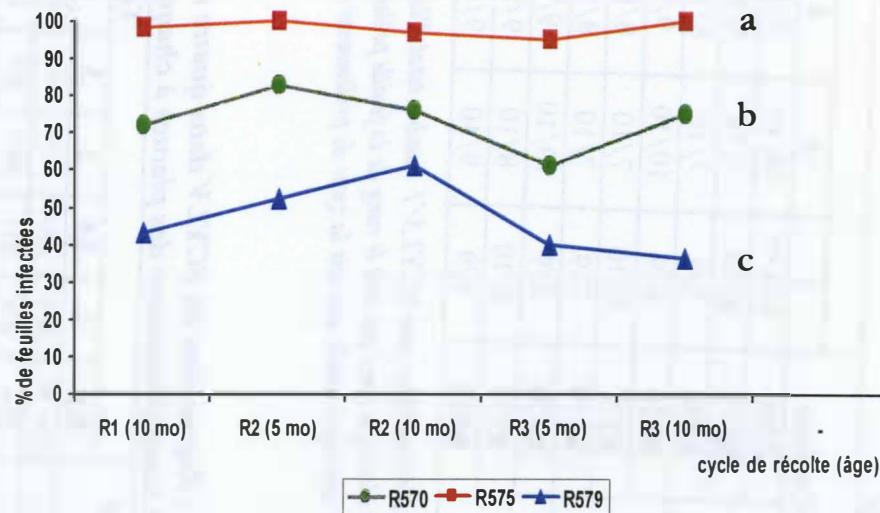
Savanna



St-Benoît, parcelle I



St-Benoît, parcelle II



CP : canne plantée, R : repousse, mo : mois, les courbes affectées de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Goodman à $P=0,05$

Figure 14 : Evolution des taux d'infection par le SCYLV chez trois cultivars et dans quatre parcelles de canne à sucre

Tableau 6 : Répartition du SCYLV dans trois cultivars de canne à sucre pendant 10 mois de croissance (résultats cumulés de deux essais avec destruction des plantes aux dates de prélèvement)

Organe	Cultivar	Temps en mois						
		1	2	3	4	5	9	10
Feuilles ^(b)	R570	9/9 ^(a)	10/10	9/9	10/10	10/10	10/10	10/10
	R577	8/10	7/10	8/10	8/10	8/10	10/10	10/10
	R579	7/9	7/10	8/10	8/10	8/10	10/10	10/10
Tige ^(c)	R570	9/9	10/10	9/9	10/10	10/10	10/10	10/10
	R577	8/10	7/10	8/10	8/10	8/10	10/10	10/10
	R579	7/9	7/10	8/10	8/10	8/10	10/10	10/10
Racines	R570	9/9	10/10	9/9	10/10	10/10	10/10	10/10
	R577	9/10	8/10	9/10	8/10	8/10	10/10	10/10
	R579	9/9	9/10	9/10	8/10	8/10	10/10	10/10

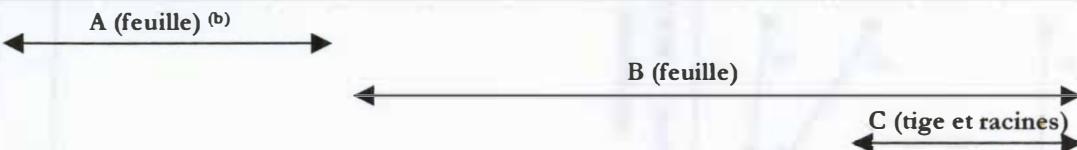
(a) nombre d'échantillons avec SCYLV / nombre total d'échantillons

(b) résultat identique quel que soit le rang de la feuille prélevée

(c) résultat identique quelle que soit la zone de prélèvement (base, milieu ou haut de tige)

Tableau 7 : Répartition du SCYLV dans quatre cultivars de canne à sucre pendant 11 mois de croissance (sans destruction des plantes à chaque date de prélèvement)

Cultivar	Temps en mois												
	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
R570	20+ ^(a)	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+
R575	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+
R577	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+
R579	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+	20+



(a) Nombre de plantes avec SCYLV / 25 plantes testées (dont 5 témoins sains)

(b) A : RT-PCR sur feuille F1, B : IE sur feuille F1, C : RT-PCR sur tige et racines

du gel ont été déposés 9 µl d'amplifiat d'ADN et 1 µl de bleu de charge (40% de saccharose et 0,25% de bleu de bromophénol). Le marqueur de poids moléculaire (phage lambda 1 kb) a été utilisé pour déterminer la taille des fragments obtenus. La migration a été effectuée dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE 1X sous une tension de 80 volts. Après la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 10 minutes puis il a été observé sous rayons ultraviolets.

3.2.4. Analyse statistique

Les données concernant le suivi des taux d'infection dans des parcelles de production ont été analysées site par site suivant la méthode de Goodman au niveau 5% (Miller, 1981). Cette analyse a été réalisée par le service de "méthodologie" du CIRAD à Montpellier avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA).

4. Résultats

4.1. Suivi des taux d'infection de trois cultivars de canne à sucre au champ

Quel que soit le lieu, les taux d'infection de chaque cultivar ont été relativement stables sur une période de 30 mois, de juillet 1998 à janvier 2001. Les taux d'infection du cultivar R575 ont toujours été les plus élevés (Figure 14 et annexe 1). Ils ont très peu varié (entre 92 et 100%) sur la période étudiée. En revanche, les taux d'infection des cultivars R570 et R579 ont plus ou moins varié selon le lieu et le temps. Les taux d'infection du cultivar R570 ont augmenté de 20% à La Mare à 93% à Saint-Benoît. Le cultivar R579 était plus infecté que le cultivar R570 à La Mare et à Savanna mais l'inverse a été observé à Saint-Benoît (sur les deux parcelles). Les taux d'infection pour les cultivars R570 et R579 ont varié avec des amplitudes de 20 à 30% respectivement sur toute la durée de l'expérience dans chaque site de culture. On notera cependant que ces variations n'ont pas correspondu à une augmentation ou à une diminution progressive des taux d'infection au cours du temps et que les taux d'infection de chaque cultivar par site de prélèvement étaient statistiquement différents entre eux.

4.2. Dynamique virale au cours de la croissance de la canne à sucre

4.2.1. Etude de la dynamique virale avec destruction des plantes aux dates de prélèvement

Le SCYLV avait une répartition systémique uniforme un mois après la germination des boutures infectées, quel que soit le cultivar (Tableau 6). Le SCYLV a été détecté dans quasiment toutes les plantes des cultivars R570, R577 et R579. Cependant, deux types d'exceptions ont été mises en évidence. Quelques différences entre les racines et le reste de la plante ont existé lors des 4 premiers mois de culture pour R577 et R579. En effet, pour 8 plantes (3 plantes de R577 et 5 plantes de R579), le SCYLV a été détecté uniquement dans les racines (RT-PCR) et pas dans la tige primaire et dans les feuilles (IE). Cependant, au bout de 4 mois de culture, la répartition du SCYLV était identique dans la partie souterraine et dans la partie aérienne. Il est également intéressant de noter que lors des 5 premiers mois de culture, 14 plantes, (8 plantes de R577 et 6 plantes de R579) avaient un état sanitaire différent de celui attendu. En effet, alors que les boutures avaient été testées en IE avant la plantation pour s'assurer de la présence de particules virales, le virus n'a pas été détecté ni dans les racines, ni dans la tige primaire, ni dans les feuilles. Après 9 mois de croissance, toutes les plantes issues de boutures infectées étaient infectées par le SCYLV. D'une manière générale, on peut dire que le SCYLV avait une répartition systémique uniforme dès le premier mois de culture et ce résultat a été similaire sur un cycle entier de culture.

Les feuilles F1 et la base des gaines enroulées de tous les talles (entre 2 et 5 talles par pot) ont également été testées lorsque les plantes étaient âgées de 5 à 10 mois. Lorsque le virus était présent dans la tige principale, il l'était également dans l'ensemble des talles apparues.

4.2.2. Etude de la dynamique virale sans destruction des plantes aux dates de prélèvement

Le SCYLV a colonisé le feuillage 15 jours après la germination des boutures infectées (Tableau 7). Le virus a été détecté par RT-PCR puis par IE dans toutes les feuilles F1 des cultivars R570, R575, R577 et R579. Cette répartition du virus dans toutes les plantes a été observé pendant 11 mois de culture. Le SCYLV a aussi été mis en évidence dans toutes les tiges et racines dès les premières recherches du virus dans ces organes (après 9 mois de culture).

5. Discussion et conclusion

Les taux d'infection au champ des cultivars de canne à sucre ont varié selon les sites de culture. Cependant, dans un site donné, ces taux ont été relativement stables au cours du temps entre 1998 et 2001. Les souches de cannes à sucre infectées des trois cultivars n'ont pas semblé "récupérer" de la maladie après une récolte. Ce phénomène de récupération existe pour d'autres maladies de la canne à sucre. Par exemple, plusieurs cultivars sensibles infectés en canne plantée par les bactéries *Xanthomonas albilineans* (Rott *et al.*, 1997) ou *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis *et al.*, 1988) n'étaient plus infectés en repousse. Un phénomène analogue a été observée pour le *Sugarcane mosaic virus* ou SCMV entre le cycle de canne plantée et la première repousse (Walker *et al.*, 1987). Par ailleurs, vu la relative stabilité des taux d'infection à La Réunion, il semble que le SCYLV ait été peu disséminé par les insectes vecteurs entre 1998 et 2001. Ces observations suggèrent que la maladie a surtout été propagée sur l'île par la plantation de boutures infectées. La situation observée à La Réunion est contraire à celle observée en d'autres lieux. En Floride ou à Hawaii, la dissémination du SCYLV est rapide et du matériel végétal sain a été réinfecté par le SCYLV en moins de trois mois après la plantation en champ (Schenck et Lehrer, 2000). De plus, les taux d'infection ont ensuite rapidement augmenté pour atteindre 46% au bout de 4 mois. Ces contaminations étaient bien dues à des pucerons car les plantes étudiées provenaient de canne à sucre issues de culture de tissus ou de graines (Comstock *et al.*, 1998 ; Schenck et Lehrer, 2000). Etant donné la stabilité des taux d'infection à La Réunion, une lutte prophylactique avec la mise en place de pépinières saines pourrait être envisagée pour lutter contre le SCYLV.

L'apparente stabilité des taux d'infection au cours du temps et la différence des taux d'infection selon les cultivars sont en faveur d'une variabilité de la résistance de la canne à sucre au SCYLV. Ainsi, le cultivar R570 serait le plus résistant à la maladie et le cultivar R575 le plus sensible. Le cultivar R579 a présenté un comportement intermédiaire. Néanmoins, vu que certains cultivars ayant des taux d'infections relativement faibles à ce jour (R570 et R579) peuvent présenter des taux d'infection très élevés (> 90% à Saint-Benoît) et que des boutures infectées ont toujours conduit à la production de plantes infectées, l'état sanitaire à la plantation semble jouer un rôle extrêmement important dans le développement de la maladie. Or, cet état sanitaire était inconnu lors de notre étude au champ. C'est pourquoi, avant de conclure à une différence de résistance entre cultivars, des travaux spécifiques de résistance devraient être menés pour évaluer l'importance de divers facteurs dans la résistance variétale au SCYLV, comme cela a été vérifié pour d'autres virus (Smith et Barker, 1999).

Il existe plusieurs types de résistance développés par les plantes contre les infections virales : 1/ la résistance à l'infection *via* les insectes en fonction du temps et des vecteurs en présence, 2/ la résistance au mouvement viral dans la plante en fonction du cultivar et du stade

de réceptivité de la plante hôte, 3/ la résistance à l'accumulation des particules virales dans la plante, 4/ la réaction d'hypersensibilité. Ces différents types de résistance ont été largement étudiés pour le PLRV, le BYDV et le CYDV-RPV (*Cereal yellow dwarf virus*) car il existe peu de plantes cultivées résistantes à ces virus qui ont causé des dégâts très importants (Barker et Waterhouse, 1999). Dans le cas du PLRV et de la pomme de terre, toutes les voies de résistance ont été étudiées. La voie la plus utilisée par les sélectionneurs est celle de la résistance à l'infection par les pucerons. Cette résistance a été étudiée grâce à des essais expérimentaux en champ et, en 1993, douze clones de pomme de terre ont été exposés à l'infection par le PLRV dans trois sites géographiquement séparés. Plus de 92% des plantes de chaque clone ont été infectées alors que certains clones l'étaient relativement moins. Un seul clone est resté sain dans les trois champs. L'analyse de ces données était néanmoins difficile car les conditions de résistance dans chacun des trois sites étaient variables au vu des différentes pressions d'infection d'un site à l'autre et d'une année à l'autre. Pour estimer la résistance des clones de pomme de terre à l'infection par le PLRV, il fallait donc appliquer des corrections mathématiques tenant compte des différents paramètres liés à l'infection (Solomon-Blackburn et Barker, 1993).

Il existe également un type de résistance aux pucerons lié aux poils glandulaires de certaines plantes. Les plantes ayant la forme B de poils glandulaires sont résistantes au PLRV, mais l'introduction de ce gène entraîne des caractéristiques agronomiques indésirables comme un retard de production et une réduction du nombre de tubercules produits. La résistance à l'accumulation virale doit être estimée par une méthode quantitative (ELISA le plus souvent). Il a été montré que certains clones de pomme de terre infectés par le PLRV avaient toujours des charges virales inférieures à 5% mais cela n'était visible que lors de la période de croissance active des plantes car, lorsque les feuilles devenaient sénescentes, la charge virale diminuait à la fois dans les plantes sensibles et dans les plantes résistantes. La résistance au mouvement viral a été caractérisée essentiellement par microscopie électronique ou immuno-empreintes. Alors que la majorité des clones de pomme de terre réagissent à l'infection par le PLRV par le développement rapide de nécroses sévères dans le phloème, certaines plantes infectées ne développent pas de nécroses et produisent des tubercules sains. Les accumulations de particules virales sont très réduites dans les tissus internes et externes du phloème de plusieurs clones très résistants, contrairement à celles de clones sensibles (Derrick et Barker, 1992). Enfin, des réactions d'hypersensibilité ont aussi été mises en évidence chez la pomme de terre infectée par le PLRV, mais ce phénomène semble assez rare pour ce pathosystème. En effet, la plupart du temps, les mécanismes de résistance se mettent en place lors de l'infection virale sans développement de nécroses.

Dans le cas du SCYLV, des travaux sur la résistance de certains cultivars à la transmission par les pucerons pourraient s'avérer intéressant au vu des résultats obtenus lors des suivis des taux d'infection. La résistance au mouvement dans la plante ne semble pas très importante dans notre pathosystème, du moins pour les cultivars étudiés, car une fois que la plante était infectée et que l'infection était généralisée, cette situation n'évoluait plus. En revanche, si on pouvait disposer d'une technique fiable de quantification de la charge virale (ELISA ou PCR), il serait intéressant d'étudier une résistance de type quantitative et notamment la résistance à l'accumulation des particules virales dans la plante.

Les *Luteoviridae* ont une répartition systémique uniforme dans la plante à travers les faisceaux du phloème (Smith et Barker, 1999). Ce phénomène n'est cependant pas toujours vérifié pour le SCYLV. En effet, il a été démontré en Guadeloupe et en serre à Montpellier que le SCYLV est parfois détecté dans les feuilles mais pas dans les tiges, et *vice-versa* (Daugrois *et al.*, 2000 ; Chatenet, communication orale). Cette répartition irrégulière du virus dans la plante a été mise en évidence dans les cultivars étudiés à La Réunion lors de l'essai "impact du SCYLV sur la

canne à sucre" (Chapitre 1), mais pas en conditions de serre. Dans ce cas, 15 jours après la germination de boutures infectées, le SCYLV avait une répartition systémique uniforme dans les cultivars R570, R575, R577 et R579. Lorsque la canne à sucre était infectée par le SCYLV, celui-ci était détecté dans tous les organes de la plante : l'ensemble du feuillage, les tiges primaires, secondaires et tertiaires et les racines. Cette distribution du virus dans toute la plante était identique pendant toute la période de croissance de la canne à sucre. Ce phénomène a été constaté en utilisant des lots de plantes différents, des modes de prélèvements différents (destructif et non destructif) et des outils de diagnostic différents (IE et RT-PCR). Cependant, étant donné que les outils utilisés au cours de notre étude ne permettaient pas une quantification de la charge virale, des différences de résistance variétale liées à des différences de concentration virale ne sont pas à exclure. A La Réunion, on observe une dissémination rapide des particules virales dans la plante lorsque des boutures infectées sont plantées. En revanche, à Hawaii, quand des plantes saines sont infectées par le SCYLV après une piqûre de pucerons dans la partie apicale de la tige, 11 semaines sont nécessaires pour observer une répartition généralisée du virus dans la plante (Lehrer *et al.*, 2000). Le temps de dissémination dans la plante varie donc aussi en fonction du site d'infection.

IV. CHAPITRE 3 : TRANSMISSION PAR LES INSECTES VECTEURS

1. Introduction

La transmission du SCYLV par des insectes vecteurs a déjà fait l'objet de plusieurs études. Lockhart *et al.* (1996) ont montré pour la première fois que le SCYLV était transmissible par pucerons. Un peu plus tard, la même équipe a partiellement démontré le postulat de Koch en reproduisant les symptômes typiques de la maladie après transmission du SCYLV par les pucerons *Melanaphis sacchari* et *Rhopalosiphum maidis* de cannes à sucre infectées à cannes à sucre saines. Etant donné que le virus n'avait pas été purifié avant le passage d'une plante à l'autre, la transmission simultanée d'un autre agent pathogène ne pouvait pas être exclue. Ces résultats, associés à d'autres, constituent cependant des arguments très forts pour considérer le SCYLV comme un agent causal du YLS (Scagliusi et Lockhart, 2000). En 2000, il a aussi été montré à Hawaii que *Melanaphis sacchari* est un vecteur très efficace pour transmettre le SCYLV au champ à des cannes saines issues de culture *in vitro* (Schenck et Lehrer, 2000). *Rhopalosiphum maidis* et *R. rufiabdominalis* sont apparus comme étant des vecteurs médiocres du SCYLV, alors que *Siphula flava* et *Hysteroneura setariae* n'ont pas du tout pu transmettre le virus. En conditions d'inoculation contrôlées, aucune des huit principales mauvaises herbes présentes dans les champs de canne à sucre à Hawaii n'a pu être infectée par le SCYLV via *Melanaphis sacchari* (Lehrer *et al.*, 2001a). En revanche, le SCYLV a pu être transmis par *Melanaphis sacchari* à d'autres *Poaceae* comme le maïs, le riz, le blé, l'orge et l'avoine. Le pourcentage de transmission était faible (<10%) pour le maïs et le riz, mais il était élevé (> 90%) pour les trois autres espèces (Schenck et Lehrer, 2000).

Au vu de la stabilité des taux d'infection dans les parcelles de canne à sucre à La Réunion, entre 1998 et 2001, nous avons émis l'hypothèse que le SCYLV était surtout disséminé sur cette île par la plantation de boutures infectées, et non par l'intermédiaire d'insectes vecteurs (Chapitre 2). La transmission du SCYLV à La Réunion par les insectes vecteurs ne semble pas être aussi rapide ou aussi fréquente qu'à Hawaii ou en Floride par exemple (Comstock *et al.*, 1998, Schenck et Lehrer, 2000). Dans le but de déterminer si cette transmission a bien lieu à La Réunion et afin d'obtenir des informations préliminaires concernant la vection du SCYLV par des insectes, des colonies de pucerons présentes dans une zone cannière de La Réunion ont été collectées. Les différentes espèces de pucerons ont été identifiées puis utilisées pour préciser si elles étaient porteuses du SCYLV. Par ailleurs, des plantes saines d'un cultivar sensible au SCYLV (R575), et dont les taux d'infection avoisinent les 100% quel que soit le lieu de prélèvement (Chapitre 2), ont été assainies par culture de méristème. Après un sevrage en serre étanche aux insectes, elles ont été plantées en champ dans le but d'étudier l'importance des pucerons dans la dissémination de la maladie à La Réunion.

2. Transmission des virus par insectes vecteurs

2.1. Cas des phytovirus

Les virus sont des parasites endocellulaires obligatoires qui survivent en se répliquant au sein d'une cellule hôte. Avant la mort de cette cellule, le virus doit être capable d'infecter d'autres cellules, d'où un déplacement sur courte distance de cellule à cellule via les plasmodesmes, ou un déplacement sur longue distance via les tissus vasculaires (Chapitre 2). Enfin, avant la mort de l'hôte, le virus doit être capable de se transmettre à d'autres hôtes via le passage par les semences, par voie végétative, par contact avec d'autres plantes ou par des organismes vecteurs (champignons, nématodes, acariens ou insectes). Les insectes vecteurs dont l'appareil buccal est

Tableau 8 : Les différentes phases de transmission des phytovirus

VECTEUR	PLANTE
ACQUISITION : moment où l'insecte acquiert le virus	
LATENCE : période entre l'acquisition et la capacité à transmettre	
INOCULATION : introduction du virus dans une plante saine	INCUBATION : période entre l'inoculation et l'apparition des symptômes
RETENTION : période pendant laquelle l'insecte reste infectieux	

Tableau 9 : Classification des virus en fonction de leur mode de transmission

Phases de transmission	VIRUS NON CIRCULANT		VIRUS CIRCULANT	
	NON PERSISTANT	SEMI PERSISTANT	PERSISTANT	
			NON MULTIPLIANT	MULTIPLIANT
Acquisition	oui (secondes-minutes)	oui (minutes)	oui (minutes-heures)	oui (minutes-heures)
Latence	non	non	oui (heures-jour)	oui (jours-semaine)
Rétenion (dans l'insecte)	oui (minutes-heures)	oui (minutes-heures)	oui (jours-mois)	oui (jours-mois)
Persistante du virus après la mue	non	non	oui	oui
Spécificité agent/vecteur	faible	grande	grande	grande

entre parenthèses : temps requis

de type piqueur-suceur (les homoptères dont les pucerons, les cochenilles, les aleurodes et les cicadelles, les hétéroptères dont les punaises et les thysanoptères dont les thrips) sont les modèles les plus étudiés (Lett *et al.*, 2001 ; Semal, 1989).

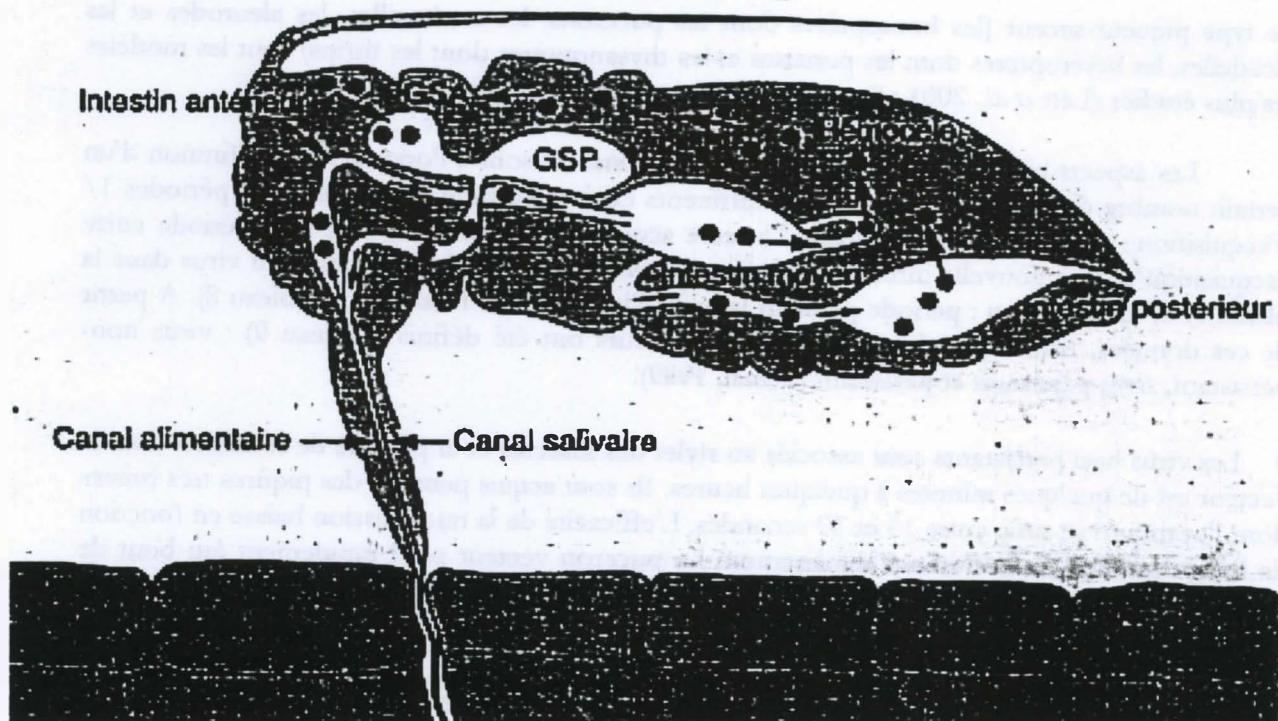
Les aspects biologiques de l'interaction virus/insecte sont à l'origine de la définition d'un certain nombre de phases qui portent sur différents critères comme la longueur des périodes 1/ d'acquisition : période pendant laquelle l'insecte acquiert le virus, 2/ de latence : période entre l'acquisition et une nouvelle infection, 3/ d'inoculation : période d'introduction du virus dans la plante et 4/ de rétention : période pendant laquelle l'insecte reste infectieux (Tableau 8). A partir de ces données, trois types de relations virus/vecteurs ont été définis (Tableau 9) : virus non-persistant, semi-persistant et persistant (Semal, 1989).

- Les virus non persistants sont associés au stylet des insectes et la période de rétention dans le vecteur est de quelques minutes à quelques heures. Ils sont acquis pendant des piqûres très brèves dont l'optimum se situe entre 15 et 30 secondes. L'efficacité de la transmission baisse en fonction de l'augmentation de la durée d'alimentation. Le puceron vecteur perd rapidement (au bout de quelques minutes) la capacité d'inoculer le virus à des plantes successives. Ces virus sont en général transmissibles par voie mécanique.
- Les virus semi-persistants sont associés à l'appareil digestif antérieur du vecteur et la période de rétention dans le vecteur est de quelques minutes à quelques heures. L'optimum de transmission est obtenu avec des piqûres d'acquisition de 12h et des piqûres d'inoculation de 6h ; la persistance est de l'ordre de 1 à 3 jours. L'efficacité de la transmission s'accroît lorsque la durée d'alimentation infectieuse augmente suggérant que le virus est accroché de manière stable. Il s'accumulerait jusqu'à ce que les sites d'accrochage soient saturés, puis il serait relâché progressivement lors des piqûres. Ces virus sont en général difficilement transmissibles par voie mécanique.

Les virus non persistants sont adsorbés sur l'épicuticule des stylets et les virus semi-persistants sur la partie antérieure du système digestif. Etant donné que l'épicuticule des stylets et la partie antérieure du système digestif font partie de la cuticule, ces virus sont perdus à chaque mue de l'insecte vecteur. Ils ont été qualifiés de virus non circulants car ils ne traversent aucune membrane cellulaire et ne pénètrent pas dans l'hémolymphé de l'insecte vecteur.

- Les virus persistants ont des périodes d'acquisition et d'inoculation de l'ordre de quelques minutes à quelques heures. Après la piqûre d'acquisition, il existe une période de latence (avec absence de transmission) à l'issue de laquelle l'insecte peut transmettre le virus en conservant son pouvoir vecteur pendant de longues périodes. En effet, ces virus sont transmis selon le mode circulant car ils sont internalisés après ingestion et ne sont pas perdus au cours des mues. Le vecteur reste généralement infectieux à vie, après une première acquisition virale. Ces virus ne sont pas transmissibles par voie mécanique.

Les virus circulants sont séparés en deux groupes : les virus multipliants, capables de se répliquer dans les insectes vecteurs (cas des *Rhabdoviridae*), et les virus non multipliants, qui ne s'y répliquent pas (cas des *Luteoviridae*).



GSA : glandes salivaires accessoires, GSP : glandes salivaires principales

Figure 15 : Circuit des particules virales de Luteoviridae dans le corps d'un puceron (Gildow, 1999)

2.2. Cas des Luteoviridae

Les *Luteoviridae* sont des virus transmis uniquement par les pucerons selon un mode circulant, persistant et non multipliant (Brault *et al.*, 2001 ; Gildow, 1999).

Les particules virales sont ingérées avec la sève lors de la prise de nourriture du puceron sur une plante virosée et elles circulent dans le tube digestif de l'insecte (Brault *et al.*, 2001). Elles sont reconnues par des récepteurs potentiels localisés sur la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin moyen ou postérieur, selon les virus. Cette reconnaissance spécifique est suivie de la pénétration des virions dans des vésicules de clathrine. Ces vésicules migrent ensuite jusqu'à la membrane basale des cellules épithéliales avec laquelle elles fusionnent, libérant ainsi les virions dans l'hémolymphé où les virus interagissent avec une protéine bactérienne appelée symbionine. Celle-ci est abondamment sécrétée par des endosymbiontes primaires (genre *Buchnera*) présents dans l'hémolymphé du puceron. La symbionine est un homologue de la protéine GroEL d'*Escherichia coli* et pourrait agir comme une protéine chaperon sur le repliement des protéines. La protéine de translecture (RT) du PLRV (*Potato leafroll virus*) et du BWYV (*Beet western yellow virus*) se lie à la symbionine et cette interaction maintiendrait l'intégrité de la particule virale dans l'hémolymphé. En effet, des études ont montré que l'hémolymphé est un environnement hostile aux agents pathogènes car il joue un rôle actif dans les mécanismes de défense. Cependant, les virus de la famille des *Luteoviridae* ont développé un mécanisme pour contourner cette défense immunitaire. Les particules virales migrent ensuite jusqu'au niveau des glandes salivaires accessoires (GSA). A ce niveau, elles traversent la lamelle basale, puis elles passent dans des vésicules d'endocytose grâce à une reconnaissance par des récepteurs spécifiques. Ces vésicules migrent jusqu'au pôle apical des cellules glandulaires et fusionnent avec la membrane plasmique, libérant ainsi les particules virales dans la salive de l'insecte (Figure 15). Cette salive virulifère sera ensuite libérée dans le phloème d'une plante saine lors d'une prise de nourriture. Trois barrières principales traversées par les *Luteoviridae* ont été identifiées dans le puceron : la membrane apicale des cellules intestinales, la lamelle basale et la membrane basale des cellules des GSA. La transmission des *Luteoviridae* par leur vecteur est très spécifique et chaque espèce virale est transmise efficacement par seulement une ou deux espèces de pucerons. On suppose que ce degré de spécificité élevé dépend des interactions qui peuvent s'établir entre les protéines virales et les récepteurs membranaires potentiels situés dans le corps du puceron.

Le rôle de la capsidie virale dans la spécificité vectrice a été élucidé grâce aux travaux de Rochow sur la transcapsidation entre différents virus de cette famille (Rochow, 1977). Ainsi, la co-infection d'une même plante par deux virus proches conduit à la formation de particules hybrides composées de l'ARN d'un virus et de la capsidie de l'autre virus ; dans ce cas, la spécificité de transmission est déterminée par la nature de la capsidie de ces particules hybrides. D'autres travaux ont ensuite porté sur le rôle respectif des protéines constitutives de la capsidie, la CP et la RT qui sont toutes les deux susceptibles d'interagir directement avec les récepteurs potentiels des pucerons. L'étude de la transmissibilité de mutants du BWYV et du BYDV-PAV dépourvus de la protéine RT a révélé le rôle crucial de cette protéine dans la vection. Ces mutants sont capables de former des particules virales qui se multiplient dans la plante mais qui ne sont pas transmissibles par les pucerons (Brault *et al.*, 2000). Une étude de mutagenèse ciblée avec le BWYV a permis de localiser les domaines peptidiques nécessaires à la transmission dans la partie centrale de la protéine qui est très conservée chez les *Luteoviridae*. Par ailleurs, le changement d'un seul acide aminé dans la partie variable de la protéine RT du PLRV a aussi entraîné une réduction très importante du taux de transmission de ce virus (Jolly et Mayo, 1994). Une co-acquisition de PLRV purifié et d'anticorps monoclonaux dirigés contre la CP de ce virus a conduit à une inhibition de la transmission (Van den Heuvel *et al.*, 1993). La CP possède donc également des déterminants essentiels à la transmission.

2.3. *Epidémiologie des Luteoviridae*

Dans les pays tempérés, les *Luteoviridae* sont le plus souvent inféodés à des cultures annuelles (Brault *et al.*, 2001). Leur cycle épidémiologique annuel comprend deux phases successives : l'épidémie primaire pendant laquelle le virus est introduit dans la culture et forme des foyers primaires, et l'épidémie secondaire au cours de laquelle le virus est disséminé au sein de la culture à partir des foyers primaires (Robert et Lemaire, 1999). Les *Luteoviridae* n'étant pas transmissibles par les graines, l'épidémie primaire est sous la dépendance de pucerons. Selon la culture, l'épidémie primaire a lieu en automne (céréales d'hiver, colza...) ou au printemps (betterave, maïs, pomme de terre, légumineuses, cultures maraîchères...). Chez la pomme de terre, toutefois, l'épidémie primaire de PLRV peut résulter de l'utilisation de tubercules contaminés l'année précédente lors de la production de plants ; c'est pourquoi, les plants de pomme de terre subissent une sélection sanitaire rigoureuse avant la plantation. L'intensité de l'épidémie primaire dépend moins de l'intensité des vols de pucerons que de leur précocité, et surtout de leur infectivité (capacité du puceron à héberger le virus et à le transmettre à une plante). De plus, la persistance des *Luteoviridae* dans le vecteur implique que celui-ci est susceptible de les disséminer sur de longues distances. L'épidémie secondaire résulte des populations de pucerons (principalement des aptères) qui colonisent la culture en se déplaçant sur de courtes distances de plante à plante. Le virus est ainsi disséminé à partir des foyers primaires et peut, dans les cas graves, s'étendre à l'ensemble de la parcelle. D'après une étude portant sur l'évolution des colonies d'*Aphis fabae* dans des champs de féverole de printemps en Alsace, il a été montré que les premiers pucerons apparaissaient en général au printemps et étaient issus des larves déposées par des formes ailées (Bouchery, 1977). Un vingtaine de jours plus tard, on pouvait compter environ 100 pucerons par colonie. Trente jours après ces premières apparitions, la moyenne des pucerons par colonie était de 1200 individus. Les pucerons sont capables de se multiplier très vite de part leur mode de reproduction (parthénogénétiques et vivipares). Les formes ailées disparaissent pendant toute la phase de croissance des colonies. Ainsi, la dispersion secondaires n'est due qu'aux formes aptères. Lorsque les populations deviennent trop importantes, les formes ailées réapparaissent et quittent la colonie. Les populations régressent alors rapidement pour disparaître complètement au bout de deux mois environ.

Les phases de latence du cycle annuel (période hors culture : l'hiver pour les cultures de printemps et l'été pour les cultures d'hiver) sont également importantes pour le développement des l'épidémies. Pendant cette période, d'autres plantes cultivées ou des adventices servent de relais (hôtes réservoirs) pour le virus et pour le vecteur. Dans une perspective d'épidémiologie et de prévention de risques, il est primordial de connaître ces réservoirs de virus et/ou de pucerons vecteurs.

Le déroulement d'un cycle épidémiologique est sous la dépendance d'un ensemble complexe de facteurs abiotiques et biotiques (Robert et Lemaire, 1999). Les facteurs climatiques sont prépondérants car ils agissent directement sur les populations et le cycle des vecteurs en influençant la survie hivernale, la précocité et l'intensité des vols, la fécondité, la longévité, ainsi que l'apparition de formes ailées. Ces facteurs influent également sur les populations de plantes réservoirs dont la survie hivernale ou estivale conditionne le maintien de la population virale (Brault *et al.*, 2001). Parmi les facteurs climatiques, la pluviométrie est généralement considérée comme ayant un rôle limité sur les populations de pucerons car ces dernières se protègent de la pluie en se mettant à l'abri sous les feuilles. Cependant, la pluie a un effet bénéfique sur les plantes en lavant le miellat sécrété par les pucerons (Bouchery, 1977). La température est considérée comme le facteur le plus important. Elle agit sur le développement des pucerons car elle régule les vitesses de développement. La température optimum se situe entre 22 et 25°C, mais elle est variable selon les espèces de pucerons.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel

Les vitroplants de canne à sucre ont été produits à partir de tiges du cultivar R575 prélevées au champ, à Saint-Benoît (station CERF). Ces tiges étaient infectées par le SCYLV (diagnostic par IE) avant installation *in vitro*.

3.2. Méthodes

3.2.1. Culture de méristèmes

Le sommet des tiges de canne à sucre âgées d'environ six mois a été prélevé au champ et les feuilles ont été enlevées. Chaque apex mesurant environ 10 cm a ensuite été stérilisé sous une hotte à flux laminaire dans de l'eau de Javel à 12° chlorométriques pendant 10 minutes, suivi de deux rinçages de cinq minutes à l'eau stérile. Le prélèvement des méristèmes a été réalisé sous une loupe binoculaire grâce à des scalpels et des pinces stérilisées à l'étuve (1h à 180°C). Une fois le méristème prélevé (500 µm avec deux primordia foliaires), il a été placé dans des tubes en verre contenant 20 ml de milieu de culture de Murashige et Skoog (MS) légèrement enrichi en azote et contenant du charbon actif (Annexe 2). Les tubes ont ensuite été placés dans une salle climatique dont la température était maintenue à 28°C, avec un éclairage de 5000 lm/m² et une photopériode de 16h. Les explants ont été repiqués sur du milieu frais 15 jours après installation *in vitro*. La multiplication végétative des vitroplants a été réalisée dans du milieu MS liquide et dans les mêmes conditions de croissance que précédemment. Un repiquage a été réalisé toutes les trois semaines jusqu'au sevrage des vitroplants.

3.2.2. Sevrage des vitroplants

Les vitroplants ont été sortis de leur tube, rincés à l'eau stérile additionné de 0,5 g/l de bénomyl (Benlate®), puis plantés dans des pastilles Jiffy® de 7 cm de diamètre. La croissance des plantes a eu lieu en serre étanche aux insectes pendant une période de deux mois en attendant la mise en place de l'essai au champ (Photo 12).

3.2.3. Détection du SCYLV dans les vitroplants

La présence du SCYLV a été recherchée dans les vitroplants par RT-PCR, méthode fiable mais surtout plus adaptée à la morphologie des plantes. En effet, les feuilles des vitroplants n'étaient pas suffisamment rigides pour convenir à technique sérologique des IE. En revanche, l'IE a été utilisée pour vérifier l'état sanitaire de ces plantes en serre avant la plantation, et au champ après la plantation.

3.2.4. Dispositif expérimental

Cent quatorze vitroplants du cultivar R575 ont été sevrés puis plantés au champ sur la station du CIRAD à La Mare. La parcelle était constituée de 3 sillons espacés de 1,5 m et 38 vitroplants ont été plantés par sillon à raison d'un vitroplant tous les 0,75 m. Ces plantes indemnes de SCYLV ont été plantées en même temps et au milieu d'une parcelle de production de R570.

3.2.5. Piégeage des insectes vecteurs

Dans un premier temps, des pièges à insectes de type pièges jaunes à eau de fabrication artisanale ont été utilisés. Ils étaient constitués d'une tige métallique de 1,5 m de long (réglable en hauteur en faisant varier l'enfoncement dans le sol) surmontée d'une plaque de bois carrée de 30 cm de côté sur laquelle était collée une bassine jaune mat de 26 cm de diamètre contenant un mélange d'alcool 70° (1/2), d'eau (1/2) et de quelques gouttes de Tween-20. Ils ont été mis en place de mars à juin 2000 dans des champs de canne à sucre âgés de 5 à 10 mois (Photo 3). Ces champs de canne à sucre étaient situés sur les trois stations où ont été suivis les taux d'infection du SCYLV : La Mare, Saint-Benoît et Savanna. Deux pièges ont été disposés à 10 m d'intervalle dans une parcelle de 150 m² dans chaque zone de piégeage plantée avec les cultivars R570, R575 et R579. Les pièges étaient placés sur la même ligne que les cannes à sucre et à hauteur du feuillage. Toutes ces localités possédaient des stations météorologiques et les données climatiques (température, pluviométrie et force du vent) étaient disponibles. Des relevés hebdomadaires ont été effectués pour récupérer les insectes capturés et seuls les pucerons ont été pris en compte.

Dans un deuxième temps, des colonies de pucerons ont été prélevées directement sur des feuilles de divers cultivars de canne à sucre cultivés à La Mare (stations CERF et CIRAD) et âgés de deux à quatre mois. Les pucerons ont été conservés dans de l'alcool à 70°. Une partie d'entre eux a été utilisée pour l'identification des espèces et l'autre partie pour la détection de SCYLV par RT-PCR.

3.2.6. Extraction de l'ARN des pucerons

Les extractions d'ARN ont été réalisées avec le kit PUREscript™ de Gentra et toutes les étapes ont été réalisées à 4°C. Pour chaque colonie de pucerons, deux extractions ont été réalisées : l'une sur un seul puceron et l'autre sur un lot de cinq pucerons. Les insectes ont été broyés directement dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant 120 µl de tampon Cell Lysis ; 40 µl de la solution Protein-DNA precipitation ont été ajoutés au lysat avant une incubation de 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15000 g pendant 5 minutes ; 120 µl d'isopropanol (Sigma) ont été ajoutés à chaque surnageant avant de centrifuger à nouveau à 15000 g pendant 5 minutes. Les culots ont été repris avec 120 µl d'éthanol 70°, puis centrifugés pendant 2 minutes à 15000 g. L'éthanol a été enlevé avec une micropipette et les culots ont été mis à sécher à l'air libre. L'ARN a ensuite été repris avec 12 µl de la solution RNA Hydratation.

3.2.7. RT-PCR sur puceron

Les RT-PCR ont été réalisés à l'aide du Kit Ready To Go™ RT-PCR Beads (Amersham). A chaque tube de réaction ont été ajoutés : 44 µl d'eau garantie sans Rnase (Sigma), 1 µl de chaque amorce (10 µM) et 4 µl d'ARN. Les amorces YLS462 et YLS111 (Comstock *et al.*, 1998 ; Irey, communication personnelle) ont été utilisées et le cycle de réaction était le suivant : 42°C pendant 30 minutes, 94°C pendant 5 minutes, 94°C pendant 45 secondes, 56°C pendant 1 minute et 72°C pendant 90 secondes, les trois dernières étapes étant répétées 30 fois, puis 72°C pendant 10 minutes.

3.2.8. Visualisation de l'ADN

L'ADN amplifié a été mis à migrer dans un gel d'agarose à 2% et du tampon TBE (0,90 M de Tris Base, 0,90 M d'acide borique et 0,20 M d'EDTA en solution). Dans chaque puits du gel ont été déposés : 10 µl d'amplifiat d'ADN et 1 µl de bleu de charge (40% de saccharose et

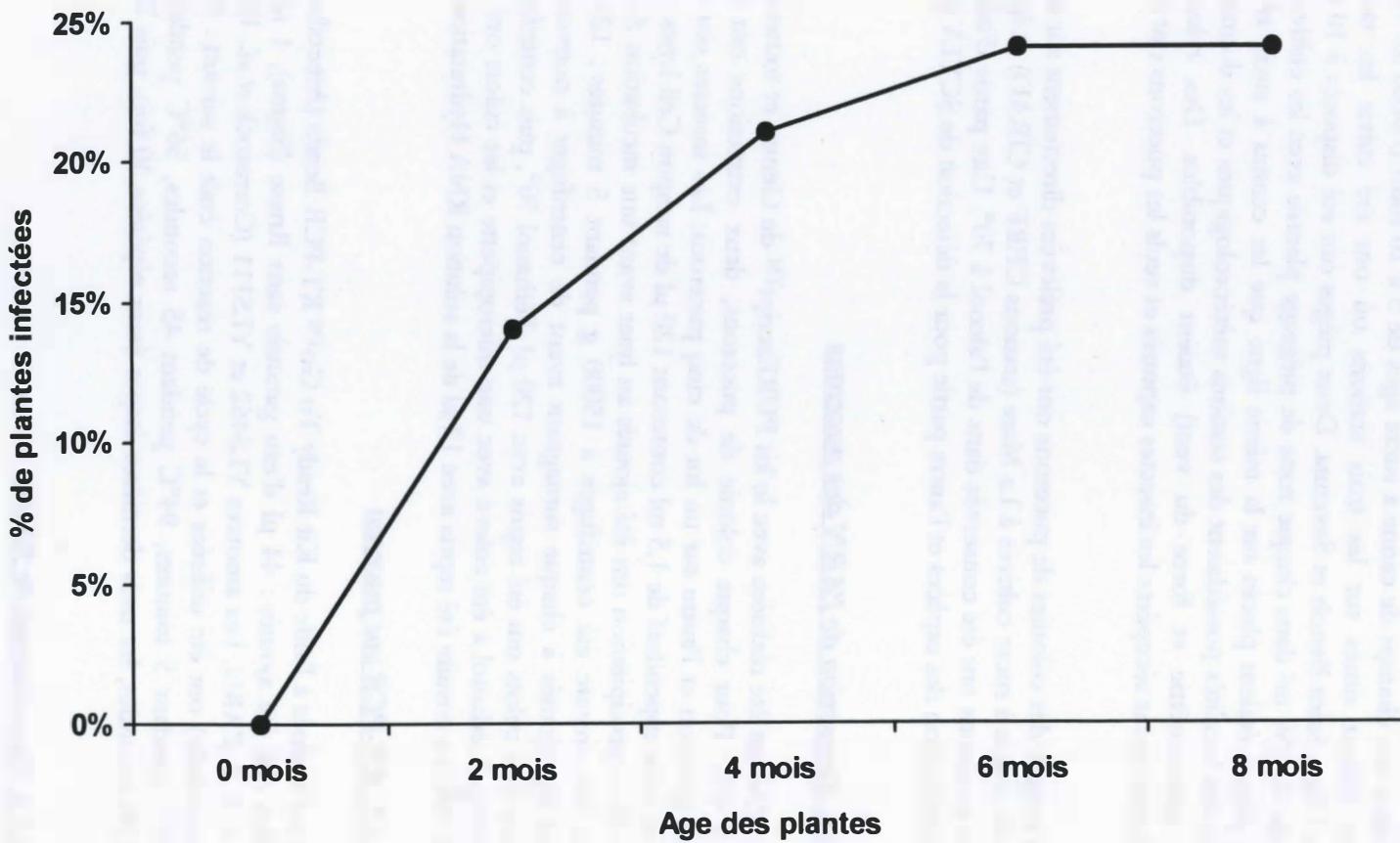


Figure 16 : Pourcentage de plantes contaminées par le SCYLV après la plantation en champ du cultivar R575 assainie par culture de méristème

Plantation (T=0) ^(a)

114

T= 2 mois ^(a)

T= 4 mois ^(b)

T= 6 mois (c)

2	2	2	6	2	4	2	4	6	2	2	4	2	2	6	4	2	2	4	6	2	2	4
2	4	4																		2		4
																			6	2		m 4 6

T= 8 mois (d)

Chaque case représente un vitroplant de canne à sucre (n°1 en bas à gauche et n° 114 en haut à droite), 2 : plantes contaminées après 2 mois de croissance au champ, 4 : plantes contaminées après 4 mois de croissance au champ, 6 : plantes contaminées après 6 mois de croissance au champ ; (a) : IE réalisées avec la feuille F1 de la tige primaire constituant la touffe de canne à sucre, (b) : IE réalisées avec une feuille F1 d'une tige prise au hasard dans la touffe de canne à sucre, (c) : IE réalisées avec quatre tiges (feuilles F1) prises au hasard dans la touffe de canne à sucre, (d) : IE réalisés sur toutes les tiges (feuilles F1), m : plante morte

Figure 17 : Distribution spatio-temporelle du SCYLV dans une plantation du cultivar R575 issu de culture in vitro indemne de SCYLV

Tableau 10 : Caractéristiques des colonies de pucerons collectées à La Mare et détection du SCYLV dans les insectes

Numéro	Puceron	Lieu de récolte à La Mare	Cultivar	Résultat RT-PCR
1	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Collection variétale CERF	R570	Négatif
2	"	"	"	Négatif
3	<i>Melanaphis sacchari</i>	"	AY7	Négatif
4	"	"	R577	Négatif
5	"	"	SP71-6163	Positif
6	"	"	R490	Positif
7	"	"	"	Positif
8	"	"	S17	Positif
9	"	Vitroplant n° 25 Essai contamination, CIRAD	R575	Négatif
10	"	Vitroplant n° 40 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif
11	"	Vitroplant n° 42 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif
12	"	Vitroplant n° 44 Essai contamination, CIRAD	"	Positif
13	"	Vitroplant n° 48 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif
14	"	Vitroplant n° 50 Essai contamination, CIRAD	"	Positif
15	"	Vitroplant n° 66 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif
16	"	Vitroplant n° 100 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif
17	"	Vitroplant n° 102 Essai contamination, CIRAD	"	Négatif

0,25% de bleu de bromophénol). Le marqueur de poids moléculaire (100 pb de Gibco) a été utilisé pour déterminer la taille des fragments obtenus. La migration a été effectuée dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE 0,5X sous une tension de 100 volts. Après la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 10 minutes puis observé sous rayons ultraviolets.

4. Résultats

4.1. Essai transmission au champ

Au moment de la plantation au champ, aucune plante issue de culture de tissus n'était infectée par le SCYLV (diagnostic par RT-PCR sur les vitroplants non sevrés et par IE après sevrage en serre étanche aux insectes). Le virus a été détecté dans 14%, 21% et 24% des plantes respectivement après deux, quatre et six mois après la plantation du cultivar R575 au champ (Figure 16). A deux et quatre mois, seules les feuilles F1 des tiges primaires ont été analysées. A six mois, quatre feuilles F1 issues de quatre tiges prises au hasard dans une même touffe ont été analysées. Quand une touffe était porteuse du SCYLV, toutes les tiges testées étaient infectées mises à part quelques exceptions. Ces exceptions correspondaient à des touffes de canne à sucre qui n'avaient pas été diagnostiquées comme porteuses du virus au cours des mois précédents. Après huit mois de croissance, aucune nouvelle infection n'a été mise en évidence et le virus a été détecté dans toutes les feuilles F1 des touffes infectées. En analysant la distribution spatiale des plantes infectées, on remarque que la dissémination entre 2 et 6 mois s'est considérablement réduite et qu'elle a principalement eu lieu autour des foyers d'infection primaires apparus entre 0 et 2 mois de croissance de la canne à sucre au champ (Figure 17).

4.2. Détection de SCYLV dans des pucerons

Durant toute la période de piégeage dans des cannes à sucre âgées de 5 à 10 mois, un grand nombre d'insectes a été collecté mais parmi ceux-ci ne figurait aucun puceron. En revanche, des colonies de pucerons ont été collectées manuellement à la face abaxiale des feuilles de canne à sucre âgées de 2 à 4 mois. Deux colonies de *Rhopalosiphum maidis* et six colonies de *Melanaphis sacchari* ont été prélevées dans la collection variétale de canne à sucre du CERF de La Mare sur les cultivars R570, AY7, R577, R490, S17 et SP71-6163 (Tableau 10). Neuf colonies de *Melanaphis sacchari* ont été collectées sur le cultivar R575 dans l'essai "transmission au champ".

Le SCYLV a été mis en évidence par RT-PCR dans 6 colonies de pucerons sur 17 (Tableau 10). Pour deux colonies (numéros 6 et 7), le SCYLV a été détecté dans les deux échantillons analysés : un seul puceron et un groupe de cinq pucerons. Pour les quatre autres colonies, seul le test réalisé avec le lot de cinq pucerons a été positif. Tous les pucerons porteurs de SCYLV appartenaient à l'espèce *Melanaphis sacchari*. Le SCYLV n'a pas été détecté dans les deux colonies de *Rhopalosiphum maidis*.

5. Discussion et conclusion

Le SCYLV, comme tous les virus de la famille des *Luteoviridae* n'est pas transmissible par voie mécanique (Smith et Barker, 1999). La transmission du SCYLV est assurée par des insectes vecteurs et plus précisément par les pucerons *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* et *R. rufiabdominalis* (Schenck et Lehrer, 2000). La présence de *R. maidis* et *M. sacchari* a été mise en évidence à La Réunion en 1988 (Remaudière et Etienne, 1988). Dans le but d'inventorier les espèces de pucerons présentes sur canne à sucre à La Réunion, des pièges ont été installés dans les zones de suivi de la maladie. Cependant, ces piégeages se sont révélés infructueux pour les pucerons. Deux explications peuvent être invoquées : soit les pièges n'étaient pas adaptés

(couleur jaune, forme et type du piège...), soit la période de piégeage (mars à juin 2000) n'était pas adéquate. En effet, les cannes à sucre étaient âgées de 5 à 10 mois, le tallage était terminé, les tiges étaient grandes (> 1 m) et aucune colonie de pucerons n'était visible. Une collecte manuelle a donc été organisée sur des cannes jeunes âgées de deux à quatre mois. Il a été montré sur fèverole, que le stade jeune plante est plus favorable à l'alimentation des pucerons. La composition de la sève très riche en acides aminés et en glucides lors de ce stade serait favorable au développement de l'insecte (Bouchery, 1977). De plus, les pucerons seraient attirés par des plantes isolées car, dans les airs, ils sont incapables de reconnaître leurs plantes hôte. Les pucerons se repèrent par rapport au reflet du sol et au contraste des plantes isolées sur celui-ci (Klingauf, 1987). Notre collecte manuelle a eu lieu sur des cannes à sucre très jeunes (âgées de moins de deux mois et mesurant moins de 1 m) et a permis de collecter des colonies de pucerons sur la face abaxiale des feuilles. Deux espèces de pucerons ont été identifiées : *Melanaphis sacchari* et *Rhopalosiphum maidis*. Les tests de biologie moléculaire (RT-PCR) effectués sur les colonies de pucerons ont révélé la présence de SCYLV dans plusieurs colonies de *Melanaphis sacchari*. A Hawaii, il a été montré que *Melanaphis sacchari* est un vecteur très efficace pour transmettre le SCYLV au champ à des cannes saines issues de culture *in vitro* (Schenck et Lehrer, 2000). *Rhopalosiphum maidis* et *R. rufiabdominalis* sont au contraire des vecteurs médiocres du SCYLV. *Melanaphis sacchari* apparaît donc comme un des vecteurs potentiels du SCYLV à La Réunion. Son efficacité de transmission du virus dans cette île reste cependant encore à préciser.

L'assainissement par culture de méristème étant une technique très efficace pour produire du matériel indemne de virus (Chatenet *et al.*, 2001), elle a été retenue pour la mise en place de cet essai, et non des boutures testées saines comme cela a été le cas pour les autres essais (Chapitres 1 et 2). L'utilisation de vitroplants (assainissement par culture de méristème et détection par RT-PCR) nous a permis d'avoir une meilleure assurance de l'état sanitaire des plantes, contrairement à l'utilisation de boutures (détection par IE). A la plantation, les plantes étaient donc toutes indemnes de SCYLV et au bout de deux mois 14% des plantes étaient contaminées. Par la suite, les nouvelles infections ont été moins nombreuses : 10% de plus au bout de six mois et ont probablement été dues à des contaminations secondaires car situées autour des foyers d'infections primaires. Les déplacements des colonies de pucerons sont très limités en terme de distance (Robert et Lemaire, 1999). Cette caractéristique permet d'expliquer la dissémination du SCYLV à partir des foyers d'infection primaires. En effet, quand un puceron décide de s'installer sur une plante, il va majoritairement donner naissance à des individus aptères et se déplacer de plante à plante sur une très courte distance. Ce n'est que lorsque la population devient trop importante que les formes ailées apparaissent et que les pucerons quittent la zone infestée pour s'établir ailleurs (Bouchery, 1977).

La dissémination d'autres virus de la famille des *Luteoviridae* a été très étudiée, et d'une manière générale, elle est très rapide. Pour le CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) par exemple, la dissémination a été étudiée plusieurs années sur des parcelles de melon au champ autour d'Avignon (Lecoq, 1999). Elle s'est manifestée sous forme d'infections primaires massives suivies de quelques infections secondaires. L'épidémie du CABYV est plus rapide que celle d'autres virus transmises par pucerons de façon non persistante, comme c'est le cas pour le WMV-2 (*Watermelon mosaic virus*). Les essais réalisés avec le SCYLV dans d'autres pays ont également montré une contamination rapide des cannes à sucre saines issus de culture de tissus ou de graines (Comstock *et al.*, 1998 ; Schenck et Lehrer, 2000). A Hawaii, des cannes à sucre du cultivar H87-4094 sensible au SCYLV ont été assainies par culture de tissus puis plantées au champ à proximité de cannes à sucre infectées par le virus : 46% des plantes étaient contaminées par le SCYLV quatre mois après la plantation (Schenck et Lehrer, 2000). Il a aussi été mis en évidence à Hawaii que, une fois la maladie présente dans la parcelle de canne à sucre, celle-ci se propageait très lentement et la vitesse de propagation du SCYLV d'une plante à l'autre a été

estimée à 5 m par an maximum (Lehrer *et al.*, 2001a). A La Réunion, les taux d'infection de la canne à sucre ont été relativement stables sur une période de 30 mois (Chapitre 2). Ces observations suggèrent que les pucerons ne sont pas beaucoup intervenus dans la dissémination de la maladie à La Réunion pendant cette période. Cependant, l'essai de transmission réalisé avec des vitroplants sains a permis de montrer que le virus peut être transmis par les insectes vecteurs : 24% des plants de canne à sucre ont été contaminés en six mois pour le cultivar le plus sensible à la maladie (R575). Cette valeur est relativement faible si on compare nos résultats avec ceux de l'essai similaire réalisé à Hawaii (Schenck et Lehrer, 2000) et si on considère que notre étude a été réalisée avec un cultivar sensible, il n'est plus possible de trouver des cannes à sucre du cultivar R575 sans SCYLV car tous les taux d'infection avoisinent les 100%. A La Réunion, les premières infections sont apparues rapidement après la plantation de plantes saines au champ. Au bout de deux mois, 14% des touffes de canne à sucre, essentiellement constituées de tiges primaires, étaient infectées par le SCYLV. Ce pourcentage a encore augmenté par la suite, mais avec des taux nettement moins importants que lors des premiers mois de croissance au champ. Ainsi, après six mois de croissance, 24% des plantes étaient infectées et cette valeur n'avait pas évolué deux mois plus tard. Par ailleurs, il a été noté que les tiges de canne à sucre infectées après deux mois de croissance au champ étaient toujours localisées autour des touffes déjà colonisées par le virus. On peut donc logiquement penser que les premières infections correspondent à des infections primaires et que les suivantes correspondent à des infections secondaires à partir des foyers primaires. Ces observations sont à confirmer par d'autres essais réalisés à différentes périodes de l'année. Si elles étaient vérifiées, il apparaîtrait que la vitesse de dissémination de la maladie à La Réunion est différente de celle observée dans d'autres pays ; la proportion de plantes malades due aux pucerons serait faible (limitée à une fenêtre de contamination très réduite) comparée à celle due à la plantation de boutures contaminées. Ce résultat laisse espérer qu'une lutte prophylactique (pépinières de plantes saines) associée à une lutte chimique ou à un décalage des dates de plantation (pour réduire la constitution de foyers primaires) seraient efficaces pour limiter l'extension de la maladie à La Réunion. Les populations de pucerons peuvent être très variables selon les années en fonction des facteurs climatiques. En Angleterre par exemple, d'une année à l'autre, on pouvait observer quelques dizaines à plusieurs milliers de pucerons de l'espèce *Aphis fabae* sur féverole (Bouchery, 1977). Il est donc indispensable d'acquérir des connaissances plus détaillées sur les populations de *Melanaphis sacchari* à La Réunion et de connaître leurs cycles épidémiologiques au cours de l'année en fonction des différentes localités.

V. CHAPITRE 4 : DIVERSITE GENETIQUE DU SCYLV

1 Introduction

Le SCYLV est présenté dans le 7^e rapport de l'ICTV ("International Committee on the Taxonomy of Viruses") comme un membre non classé des *Luteoviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Les virus de cette famille forment un groupe hétérogène incluant trois genres : les *Luteovirus*, les *Polerovirus* et les *Enamovirus*. La structure globale du génome du SCYLV se rapproche cependant de celle du groupe des *Polerovirus* (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). A ce jour, seulement deux isolats de SCYLV ont été étudiés et entièrement séquencés, l'un provenant de Floride et l'autre du Brésil. Les régions codantes de la protéine de capsid de ces deux isolats ne varient que de deux nucléotides, mais les particules virales ont cependant été décrites comme ayant des propriétés sérologiques légèrement différentes : les virions de la souche de Floride réagissent fortement avec l'anti-sérum produit contre le *Polerovirus CYDV* (*Cereal yellow dwarf virus*) sérotype RPV (Scagliusi et Lockhart, 2000), tandis que l'isolat brésilien réagit surtout avec l'anti-sérum produit contre le *Luteovirus BYDV* (*Barley yellow dwarf virus*) sérotype PAV (Vega *et al.*, 1997). Les virus à ARN présentent une forte capacité de recombinaison au cours de leur évolution (Mayo et Miller, 1999). Cette caractéristique semble également exister chez le SCYLV étant donné que son génome a des régions chimériques luteo et polerovirales (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000).

La large distribution du SCYLV dans le monde a conduit plusieurs équipes, notamment celles de Mirkov (Texas, USA) et de Smith (Brisbane, Australie), à étudier la diversité du génome du SCYLV. L'objectif de ces travaux était de déterminer si les différentes manifestations de YLS dans le monde correspondaient à une distribution et au mouvement d'une seule souche virale ou de plusieurs souches virales distinctes (Smith, communication orale). Suite à une étude regroupant des échantillons d'Amérique, il a été montré que les isolats du continent américain forme une "super-population" mais que des isolats de Colombie s'en éloignent génétiquement pour former un groupe distinct appelé "population C" (Moonan et Mirkov, 2001). L'hypothèse la plus probable est que la "super-population" dérive de la "population C" car la variabilité du gène codant pour la polymérase est plus grande dans la "population C" que dans la "super-population".

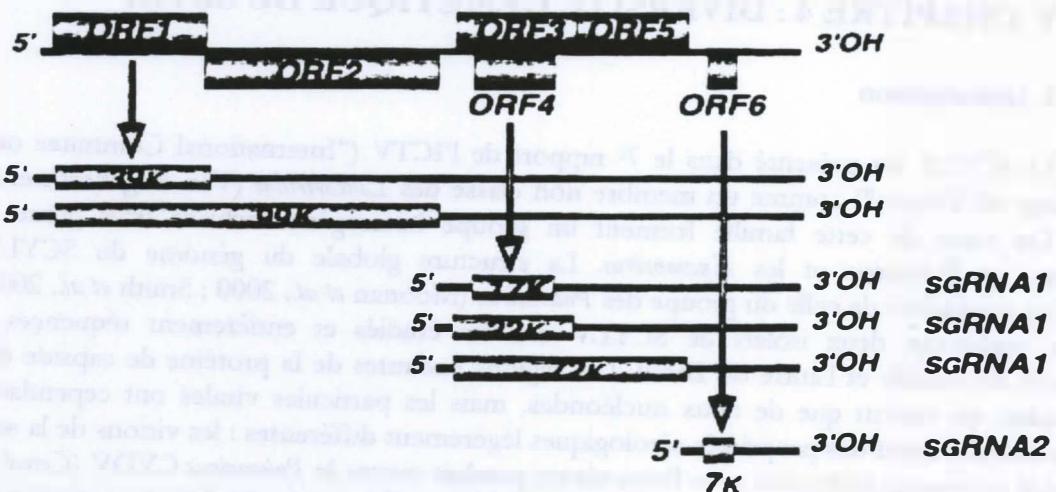
La connaissance de la structure des populations du SCYLV est essentielle dans la perspective d'une lutte génétique contre le SCYLV. L'objectif de notre étude était donc de préciser la diversité génétique du SCYLV à La Réunion en fonction de la variabilité mondiale du virus.

2. Diversité génétique des *Luteoviridae*

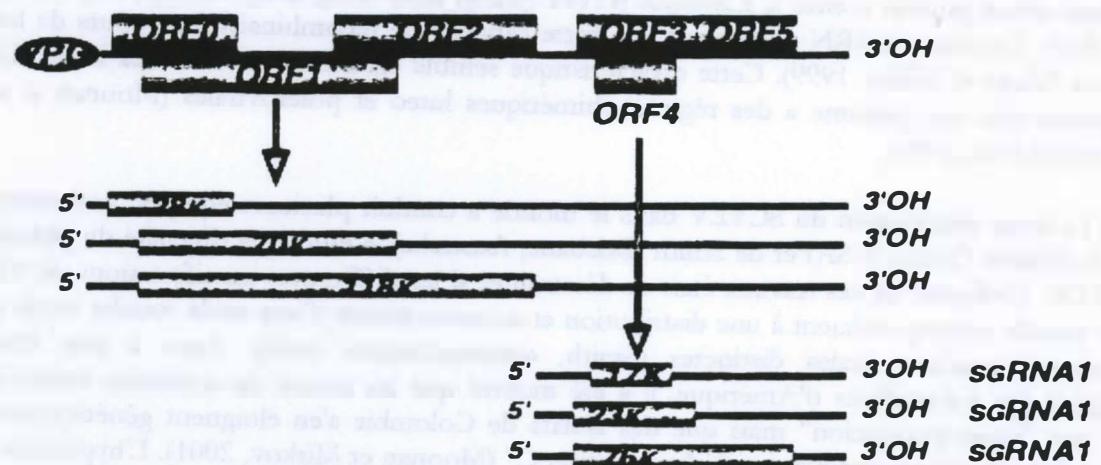
Les *Luteoviridae* ont été reconnus en 1975 comme un groupe à part entière. Ce sont des virus à particules isométriques de 24 à 28 nm de diamètre, qui renferment une molécule d'ARN monocaténaire simple brin de polarité positive.

Depuis ces 20 dernières années, on assiste à une explosion d'informations moléculaires concernant la structure des génomes viraux pour tous les taxons, y compris les *Luteoviridae*. La structure des séquences codant pour la polymérase ("RNA-dependant RNA polymerase" ou RdRp en anglais) des *Luteoviridae* a initialement servi de support pour le classement au sein de cette famille (Koonin et Dolja, 1993). La comparaison des séquences des gènes a montré que la séquence de la protéine de capsid (CP) n'était pas suffisante pour permettre la classification des

Luteovirus BYDV-PAV Genomic RNA 5677 nts



Poletovirus PLRV Genomic RNA 5882 nts



Enamovirus PEMV-1 Genomic RNA 5705 nts

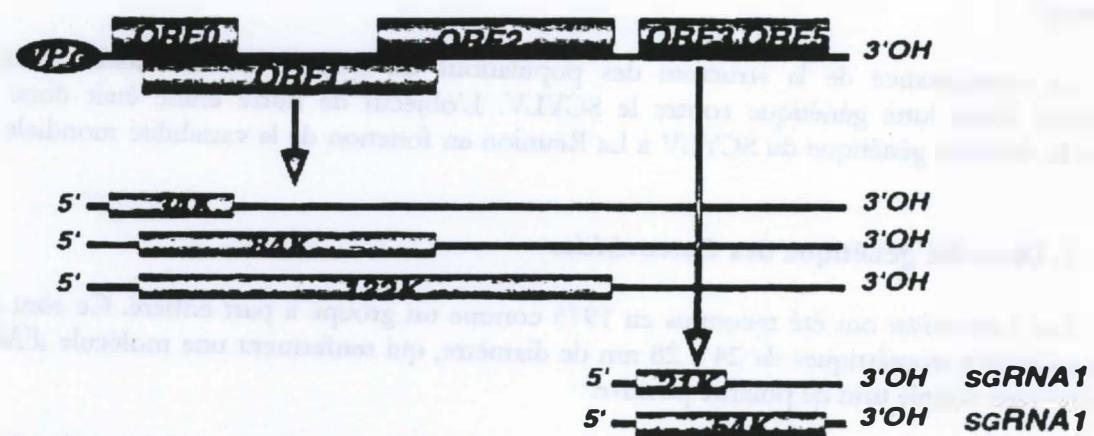


Figure 18 : Organisation du génome des trois genres de virus composant la famille des Luteoviridae (Van Regenmortel et al., 2000)

virus au sein d'un des trois genres constituant la famille des *Luteoviridae*. Les virus pour lesquels on ne dispose pas de données de séquences suffisantes ont donc été classés dans la catégorie "non affiliés à un genre". Les virus de cette famille qui ont été entièrement séquencés ne possèdent pas de queue poly-adénosine (poly-A) à l'extrémité 3' de leur génome (Mayo et Miller, 1999). La séquence complète du génome de la famille des *Luteoviridae* a été étudiée depuis 1988, ce qui a conduit à la mise en place d'une nouvelle classification séparant les *Luteoviridae* en 3 genres : *Luteovirus*, *Polerovirus* et *Enamovirus* (Mayo et Miller, 1999).

- Le genre *Luteovirus*, dont le membre type est la souche PAV du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV-PAV), est caractérisé par les cadres ouverts de lecture (ORFs) 1 et 2, dont les produits d'expression sont nécessaires à la réplication du génome (Figure 18). Ces produits présentent une parenté phylogénétique avec les protéines impliquées dans la réplication des *Carmovirus*, *Dianthovirus* et *Tombusvirus* (Brault et al., 2001). L'ORF 2 est exprimé par un mécanisme de décalage du cadre de lecture au niveau du codon de terminaison de l'ORF 1. La longueur de la séquence non codante entre les ORFs 2 et 3 est d'environ 100 nucléotides. Aucune protéine VPg ("genome-linked viral protein") liée à l'extrémité 5' du génome viral n'a pu être mise en évidence. L'ORF 0 est absent de ce genre mais on trouve un ORF 6 à l'extrémité 3' du génome.
- Le genre *Polerovirus*, dont le membre type est le virus de l'enroulement de la pomme de terre ou PLRV (*Potato leafroll virus*), se distingue des virus du genre *Luteovirus* par la présence d'un ORF 0 et d'une protéine VPg à l'extrémité 5' de leur génome, ainsi que par l'absence de l'ORF 6 (Brault et al., 2001). Leur polymérase (ORFs 1 et 2) est proche de celle des *Sobemovirus* et le mécanisme du décalage du cadre de lecture nécessaire à l'expression de l'ORF 2 se situe plusieurs centaines de nucléotides en amont du codon de terminaison de l'ORF 1. La longueur de séquence non codante entre les ORFs 2 et 3 est d'environ 200 nucléotides. Ces virus ont la capacité d'envahir des cellules hors du tissu du phloème dans les plantes co-infectées avec des virus appartenant à d'autres familles comme les *Potyviridae*.
- Le genre *Enamovirus* ne contient qu'un seul représentant, le virus de la mosaïque de l'énation du pois ou PEMV-1 (*Pea enation mosaic virus-1*). Comme les *Polerovirus*, ce virus contient une protéine VPg et un ORF 0 à l'extrémité 5' de son génome (Figure 18). Il est dépourvu d'ORF 4 et possède un ORF 5 plus court d'environ 600 nucléotides (Brault et al., 2001). Dans la nature, le PEMV-1 est toujours associé avec un *Umbravirus*, le PEMV-2 (*Pea enation mosaic virus-2*) dont la particule virale est constituée de la capside du PEMV-1. Le PEMV-1 seul est incapable d'envahir la plante entière, mais la présence du PEMV-2 permet au PEMV-1 d'infecter les cellules du mésophylle et lui confère la possibilité d'être transmis aussi bien par voie mécanique que par les pucerons.

Les protéines codées par les différents ORFs du génome des *Luteoviridae* sont les suivantes (Mayo et Ziegler-Graff, 1996 ; Smith et Barker, 1999) :

- **ORF 0** : existe seulement chez les *Polerovirus* et les *Enamovirus* et commence par un codon d'initiation AUG ; elle code pour une protéine d'environ 30 kDa dont la fonction précise est encore inconnue. Elle ne présente aucune homologie avec d'autres séquences virales. Lorsque l'ORF 0 du PLRV est exprimé dans des plantes transgéniques, les plantes développent des symptômes de jaunisse très sévères, ce qui suggère son rôle dans la symptomatologie (Van der Wilk et al., 1997). La protéine P0 du BWYV (*Beet western yellow virus*) n'est, quant à elle, pas nécessaire à l'infection de la plante et à la transmission du virus par les pucerons (Ziegler-Graff et al., 1996).

- **ORF 1** : code pour une protéine d'environ 70 kDa que l'on retrouve chez tous les membres des *Luteoviridae*. Cette protéine correspondrait à une sérine protéase impliquée dans la réPLICATION virale. L'analyse des séquences nucléotidiques a montré que cet ORF contient chez les *Polerovirus* et *Enamovirus* une séquence codant pour des acides aminés correspondant à une partie de la VPg.
- **ORF 2** : est similaire à l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) des *Sobemo* et *Barnavirus*. La protéine P2 est exprimée par un mécanisme de décalage du cadre de lecture lors de la traduction de l'ORF 1. Elle est donc synthétisée sous la forme d'une protéine de fusion P1-P2 de 120 kDa environ et elle est impliquée dans la réPLICATION virale.
- **ORF 3** : code pour la protéine majeure de la capsid (CP) de 22 kDa. Cette protéine est très conservée chez les *Luteoviridae*. La formation de particules virales est inhibée par la suppression ou l'altération de cet ORF. Elle aurait également un rôle dans l'interaction entre le virus et le vecteur pendant la transmission, ainsi que dans le mouvement longue distance des particules virales dans la plante.
- **ORF 4** : code pour la protéine de mouvement (MP). Elle est indispensable pour tout déplacement des particules virales dans la plante.
- **ORF 5** : code pour une protéine de translecture (Readthrough ou RT en anglais) de 52 kDa pendant l'elongation de l'ORF 3. Cette protéine mineure de la capsid semble jouer un rôle important dans la transmission des *Luteoviridae* par les pucerons, mais également pour le mouvement systémique du virus dans la plante en facilitant le transit des particules virales entre les tubes criblés et les cellules compagnes.
- **ORF 6** : est très petit et assez rare. On le rencontre dans la partie 3' du génome du BYDV-PAV et du MAV seulement (*Luteovirus*). Son rôle est encore inconnu, mais on suppose qu'il pourrait intervenir dans la réPLICATION virale.
- **Régions non codantes (UTR)** : sont situées aux extrémités 5' et 3' terminales, mais également dans une région intergénique (entre les ORFs 2 et 3). Elles sont supposées contenir en particulier les signaux de réPLICATION du génome et de traduction des ORFs.

Les ORFs 0, 1 et 2 sont exprimés par traduction directe de l'ARN génomique (ARNg). Le premier codon de l'ARNg est le codon d'initiation AUG de l'ORF 0 pour les *Polerovirus* ou de l'ORF 1 pour les *Luteovirus* (Mayo et Miller, 1999). Chez les *Polerovirus*, la traduction est initiée par la protéine VPg présente à l'extrémité 5'. Chez les *Luteovirus*, étant donné qu'il n'y a pas de VPg ou d'autres structures particulières à l'extrémité 5', la traduction de l'ORF 1 requiert une séquence de 100 nucléotides localisée autour du 4700^e nucléotide dans la région intergénique, entre l'ORF 5 et l'ORF 6. Chez les *Luteovirus*, les ORFs 1 et 2 sont contigus. Au codon de terminaison de l'ORF 1, une séquence de nucléotides va changer le cadre de lecture lors du passage des ribosomes. Par exemple, la séquence du site de changement de cadre de lecture chez le BYDV-PAV est GGGUUUU et elle suit immédiatement le codon stop de l'ORF1. Chez les *Polerovirus*, comme il y a un recouvrement des deux ORFs, le changement de cadre de lecture va avoir lieu à une distance considérable en amont du codon stop de l'ORF 1. Cette séquence est assez instable : GGGAAC pour le BWYV et UUUAAAU pour le PLRV par exemple. Les ORFs 3, 4 et 5 sont exprimés par la traduction d'un ARN sub-génomique (sgARN1) situé en 3' de l'ARNg. Un second ARN sub-génomique (sgARN2) existe également chez les *Luteovirus*. Il régule la traduction de l'ARNg et sert de messager à l'ORF 6. Cependant, un autre sgARN2 a été identifié

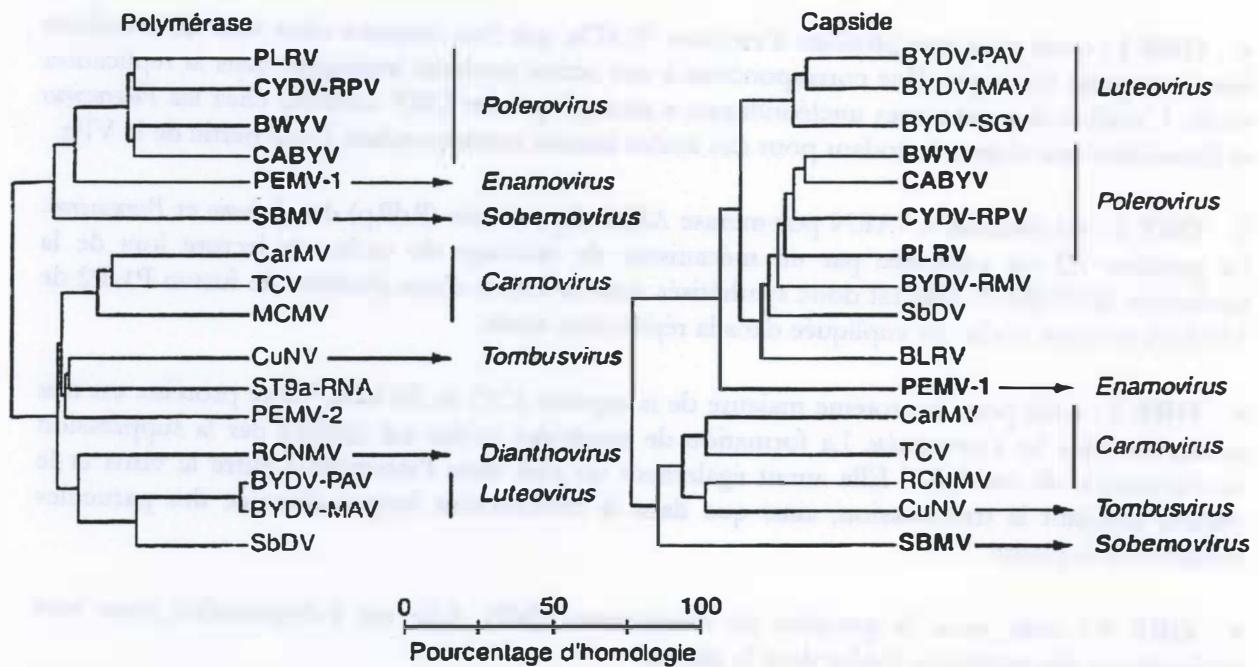


Figure 19 : Comparaison des séquences de la polymérase et de la protéine de capside des Luteoviridae et des Tombusviridae (Chaloup et Lapierre, 1995)

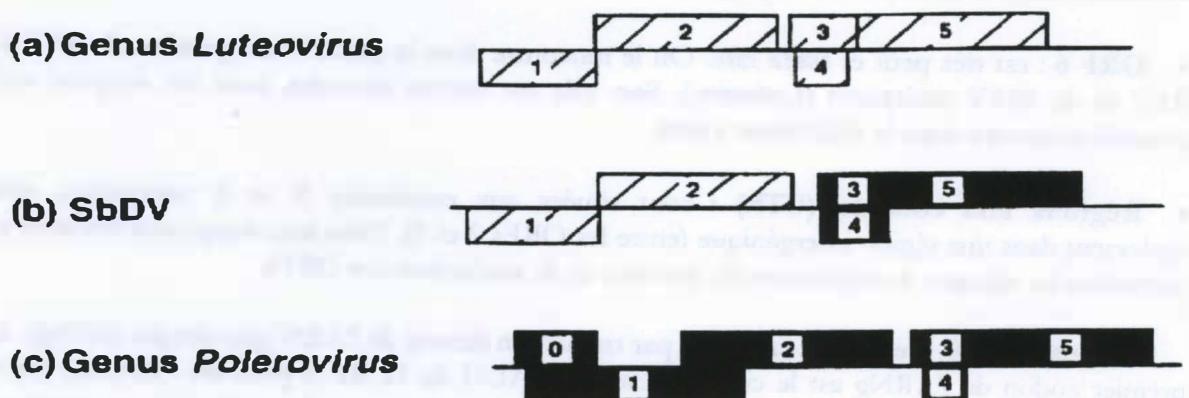


Figure 20 : Organisation du génome du SbDV (Soybean dwarf virus) illustrant la recombinaison entre les génomes ancestraux de Luteovirus (Smith et Barker, 1999)

récemment dans les plantes infectées par le PLRV (*Polerovirus*) : il correspond à l'extrémité 3' de l'ARNg et pourrait porter deux nouveaux ORFs : les ORFs 6 et 7 (Brault *et al.*, 2001).

D'une manière générale, les *Luteoviridae* présentent une grande variabilité biologique, sérologique et moléculaire (Brault *et al.*, 2001). Les virus à ARN sont particulièrement sujets à des mutations ponctuelles aléatoires qui peuvent être à l'origine de leur variabilité et de leur adaptabilité (Drake, 1993). Il est intéressant de noter que la fréquence de mutation semble être corrélée à l'étendue de la gamme d'hôtes. Ainsi, le PLRV a une gamme d'hôtes relativement étroite et une très faible fréquence de mutation. En revanche, le BWYV (*Beet western yellows virus*) qui infecte un nombre plus large d'hôtes montre de plus grandes variations de séquences (Miranda *et al.*, 1995).

Les études phylogénétiques permettent d'analyser la variabilité des espèces et d'identifier des variants de *Luteoviridae* grâce à diverses méthodes dont la plus récente est la méthode PLATO ("Partial Likelihoods Assessed Through Optimization"). Cette dernière permet d'évaluer la parenté phylogénétique des *Luteoviridae* et de déterminer les sites potentiels de recombinaison. Elle a conduit à formuler des hypothèses sur l'évolution de ces virus. Elle ne permet pas de détecter les événements récents de recombinaison, mais de localiser les domaines ayant la plus grande probabilité de se recombiner parmi un ensemble de génomes viraux. L'existence de sites où ont pu se produire des recombinaisons dans le génome des *Luteoviridae* a conduit à l'identification des ancêtres viraux ayant pu donner naissance à cette famille de virus (Moonan *et al.*, 2000). Les trois genres actuels de cette famille proviennent probablement d'un ancêtre commun qui a ensuite divergé en deux genres distincts, suite à des recombinaisons avec des virus actuellement représentés par les *Sobemovirus* et les *Tombusviridae*.

La comparaison des séquences génomiques des *Luteoviridae* avec d'autres phytovirus a permis de mettre en évidence des phylogénies différentes en fonction de la région considérée. Selon l'ORF étudié, les séquences sont plus ou moins conservées chez les *Luteoviridae*. Celles de la CP sont les plus homologues et ont un minimum de 40% d'identité entre elles. Au sein d'un même genre, c'est la protéine P2 qui est la plus conservée car les similitudes entre les P2 de deux espèces de *Polerovirus* sont supérieures à 57%. Les séquences de la CP, ainsi que l'organisation des ORFs 3, 4 et 5 sont très conservées chez les *Polerovirus* et les *Luteovirus*. A l'inverse, celles des ORFs situés à l'extrémité 5' du génome sont totalement différentes entre deux genres. D'une manière générale, les virus sont très peu différents au sein d'une même espèce. En effet, la comparaison de séquences de différents isolats de PLRV d'origines diverses (Canada, Pologne, Ecosse, Pays-Bas et Australie) n'a permis de révéler que 7% de diversité (Mayo et Miller, 1999). En revanche, il existe plus de variation chez d'autres espèces. Chez le BMYV (*Beet mild yellow virus*) et le BWYV (*Beet western yellows virus*), la CP de 38 isolats diffère de 28 acides aminés sur 202 (13,8% de dissimilarité). Il existe des variations encore plus importantes chez le BYDV et c'est pourquoi le BYDV-MAV et le BYDV-PAV appartiennent au groupe des *Luteovirus*, alors que le BYDV-RPV appartient au groupe des *Polerovirus* (Mayo et Ziegler-Graff, 1996). La RT a une partie centrale, en aval de la partie CP, très conservée au sein de la famille des *Luteoviridae*. En revanche, sa partie C-terminale est plus variable (Guilley *et al.*, 1994).

La polymérase des *Luteovirus* est proche de celle des *Carmovirus*. En revanche, celle des *Polerovirus* est similaire à celle des *Sobemovirus* (Figure 19). Cette caractéristique suggère qu'un ancêtre des *Luteoviridae* a acquis une nouvelle polymérase par recombinaison, entraînant la divergence entre les *Polerovirus* et les *Luteovirus* (Chalhoub et Lapierre, 1995). L'idée de l'intervention d'événements de recombinaison dans la séparation des deux genres est confortée par l'analyse du génome du SbDV (*Soybean dwarf virus*). Son organisation génomique le classerait dans le genre *Luteovirus* (pas d'ORF 0, similarité des polymérases et des séquences 5' et 3' non

codantes) ; cependant, les séquences des ORFs 3, 4 et 5 sont plus proches de celles des *Polovirus* (Figure 20). Un ou plusieurs événements de recombinaison entre *Luteovirus* et *Polovirus* auraient donc conduit à la formation du SbDV. Le BMYV suivrait ce même procédé de recombinaison et serait un dérivé du CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) et du BWYV. Les co-infections qui peuvent avoir lieu au sein d'une même plante entre des *Luteoviridae* et d'autres phytovirus ont probablement constitué un contexte favorable à la formation de nouvelles entités virales très importantes dans l'évolution des virus de cette famille. L'évolution des *Luteoviridae* est cependant dépendante d'interactions impliquant à la fois le virus, la plante hôte et le puceron vecteur. Chaque espèce est transmise par un vecteur spécifique, ce qui induit une pression de sélection importante sur les gènes impliqués dans le déterminisme de transmission persistante par les pucerons (Brault *et al.*, 2001).

3. La construction d'arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires

La reconstruction de l'histoire des espèces, et plus particulièrement du processus de divergence associé à l'évolution des êtres vivants, est un problème toujours fécond et d'actualité. Un regain d'intérêt a été suscité depuis la fin des années 60 par l'exploitation de données moléculaires caractéristiques du patrimoine génétique des espèces. Elle a permis de poser en d'autres termes la caractérisation des dissemblances génétiques et le modèle du processus de divergence des organismes vivants (Caraux *et al.*, 1995). On peut comparer les nucléotides et/ou les protéines. Mais, les comparaisons de séquences protéiques ne permettent de détecter que les régions codantes et donc des régions soumises à des effets de sélection.

Depuis les travaux de Darwin en 1859 affirmant que l'évolution résulte d'une sélection naturelle, l'arbre est un support formel de la représentation du processus dynamique de la diversification des espèces : les feuilles y représentent les espèces étudiées, les nœuds internes les ancêtres virtuels ayant divergé, et les arêtes les liens de filiation. Le problème posé est de retrouver cet arbre à partir des données contemporaines observées sur un ensemble d'espèces. Cette tâche est aujourd'hui facilitée par l'existence de banques de données centralisées (EMBL, Genbank...) accessibles via les réseaux informatiques.

Une fois les séquences disponibles, celles-ci doivent être alignées de manière à faire correspondre les sites analogues en tenant compte des possibles insertions/délétions. D'un point de vue informatique, l'alignement s'apparente à la recherche de la "distance d'édition", on recherche ainsi l'alignement qui minimise une fonction de coût qui est égale au nombre de substitutions + le nombre d'insertions + le nombre de délétions. D'une manière générale, la fonction de coût considère qu'une substitution a un coût moindre que celui d'une insertion-délétion (Caraux *et al.*, 1995).

Il existe deux grands types de méthode permettant la construction d'arbres phylogénétique : 1/ les méthodes basées sur les mesures de distance entre séquences prises deux à deux, c'est-à-dire le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acides aminés entre ces deux séquences, et 2/ les méthodes basées sur les caractères qui s'intéressent au nombre de mutations (substitutions/insertions/délétions) qui affectent chacun des sites (positions) de la séquence (Anonyme, 2001).

3.1. Méthodes fondées sur les distances

Ce sont des méthodes de construction d'arbres phylogénétiques sans racine basées sur la recherche de séquences (d'acides aminés ou de nucléotides) les plus proches, et ceci, à chaque étape de regroupement.

3.1.1. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)

Cette méthode est utilisée pour construire des arbres phylogénétiques lorsque les séquences ne sont pas trop divergentes. Elle fait appel à un algorithme de regroupement séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité, et la construction de l'arbre se fait pas à pas, grâce à cet ordre. Dans un premier temps, il y a l'identification des deux séquences les plus proches. Ce groupe est ensuite traité comme un tout dans la recherche de la séquence la plus proche, et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes. L'UPGMA suppose que tous les individus comparés sont au même temps d'évolution par rapport à une ancêtre commun et que le taux de mutation est fixe (Perrier, communication orale). L'inconvénient majeur de l'UPGMA est la sensibilité de la méthode à des taux de mutations différents sur les différentes branches de l'arbre (Anonyme, 2001).

3.1.2. NJ (Neighbor-Joining)

Cette méthode développée par Saitou et Nei (1987) tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches, c'est la méthode de distance la plus employée en matière de construction phylogénétique. Les données initiales permettent de construire une matrice qui donne un arbre en étoile. Cette matrice de distances est ensuite corrigée afin de prendre en compte la divergence moyenne de chacune des séquences avec les autres. L'arbre est alors reconstruit en reliant les séquences les plus proches dans cette nouvelle matrice. Lorsque deux séquences sont liées, le nœud représentant leur ancêtre commun est ajouté à l'arbre tandis que les deux feuilles sont enlevées. Ce processus convertit l'ancêtre commun en un nœud terminal dans un arbre de taille réduite (Anonyme, 2001). Le principe algorithmique est donc identique à celui d'UPGMA, mais la mesure de la ressemblance entre deux individus est une pondération de la distance entre ces individus par la moyenne des distances à tous les autres individus (Perrier, communication orale).

3.1.3. Méthodes dérivées des méthodes basées sur les distances

L'objet est de rechercher un arbre tel que les distances entre les individus seraient les plus proches des distances observées. Une première approche est de tester toutes les configurations possibles d'arbres et d'estimer pour chacun un critère de pertinence qui peut être la somme des carrés des écarts entre la distance observée et la distance prédictive. Cependant, le nombre d'arbres possibles croît très vite en fonction du nombre d'individus, et les méthodes exhaustives ne sont plus utilisables quand le nombre d'individus dépasse la vingtaine. Des méthodes approchées ont donc été développées, elles donnent de bonnes solutions sans que l'on puisse affirmer que ce sont les meilleures (Perrier, communication orale).

3.1.4. Les corrections des distances entre séquences de nucléotides

Lorsque le temps de divergence entre deux séquences augmente, la probabilité qu'un site muté corresponde en fait à plusieurs mutations superposées n'est plus négligeable. Ceci fait que le simple comptage des différences entre deux séquences n'est pas le reflet exact de la réalité, mais sous-estime le nombre d'événements mutationnels. On tente de corriger ce biais en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases ou acides aminés se sont substitués à un locus donné. Les premiers à avoir proposé une solution à ce problème sont Jukes et Cantor (1969). L'idée est d'estimer le vrai nombre de mutations sur un site à partir de la loi de probabilité d'apparition des événements mutationnels. Ils ont émis l'hypothèse que tous les sites sont équivalents (tous les changements ont une probabilité égale mais celle-ci varie au cours du temps), qu'il n'y a pas de

biais dans la direction du changement et qu'il n'y a pas eu ni d'insertion ni de délétion. Il existe une autre méthode de correction dite de Kimura (1980) qui est similaire à la méthode précédente, mais on a émet l'hypothèse que les taux de transition (changements entre A et G ou entre C et T) sont différents des taux de transversion (changements entre A et C ou A et T, ou entre G et C ou G et T). D'autres modèles encore plus complexes ont été proposés, ils multiplient le nombre de paramètres à établir et ne sont utilisables que dans des situations particulières.

3.2. Méthodes fondées sur les caractères

3.2.1. Méthode de Parcimonie

La parcimonie consiste à minimiser le nombre d'évènements (mutations/substitutions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre dans la topologie de l'arbre. Pour cela, cette méthode s'appuie sur différents hypothèses : 1/ les sites évoluent indépendamment les uns des autres (la séquence peut-être considérée comme une suite de caractères non ordonnés), 2/ la vitesse d'évolution est lente et constante au cours du temps. Cette méthode, quand elle est appliquée à des séquences protéiques, utilise le code génétique pour comptabiliser le nombre de substitutions nécessaires (changements de bases) pour passer d'un site à l'autre ou d'une séquence à l'autre. La méthode du maximum de parcimonie recherche toutes les topologies possibles afin de trouver l'arbre optimal (minimum), mais cela devient impossible lorsqu'on a plus de 15 séquences. Des améliorations comme la méthode de Branch et Bound diminue le nombres d'arbres à évaluer et permet de traiter jusqu'à 20 individus. Comme précédemment, des méthodes approchées ont été développées, elles agrègent les individus successivement en choisissant la meilleure arête de greffage pour chaque individu ajouté. La parcimonie offre plusieurs avantages car elle ne réduit pas la séquence à un simple nombre mais elle essaye de donner des informations sur les séquences ancestrales et elle évalue différents arbres. Les inconvénients majeurs sont la lenteur d'exécution par rapport aux méthodes basées sur les distances, la non utilisation de toutes les informations disponibles (seuls les sites informatifs sont pris en compte), et l'absence de corrections pour les substitutions multiples (Anonyme, 2001 ; Caraux *et al.*, 1995).

3.2.2. Méthode de Maximum de vraisemblance

Cette méthode de construction phylogénétique évalue, en terme de probabilités, l'ordre des branchements et la longueur d'un arbre sous un modèle évolutif donné. Le maximum de vraisemblance est une bonne méthode de construction d'arbre phylogénétique mais il faut que le modèle de départ corresponde bien aux données. Le principe est d'améliorer progressivement l'estimation des paramètres du modèle à partir des valeurs initiales. Pour fixer ces valeurs initiales, il est fréquent d'utiliser l'arbre produit par une méthode rapide comme NJ. Mais, cette méthode n'est utilisable que si on a entre 10 et 20 séquences (Anonyme, 2001 ; Caraux *et al.*, 1995).

3.3. Fiabilité des arbres phylogénétiques

Quand un arbre a été obtenu, il est intéressant d'évaluer la fiabilité de cet arbre. Pour évaluer cette probabilité, plusieurs méthodes sont disponibles (Anonyme, 2001).

3.3.1. Le bootstrap

Cette méthode largement utilisée en phylogénie a été inventée par Bradley Efron en 1979 et introduite en phylogénie en 1981 (Felsenstein, 1981) dans le package PhyliP. Le principe est de considérer les différents sites (acides aminés ou nucléotides) comme un échantillon aléatoire d'un ensemble beaucoup plus grand qu'est le génome complet. Le hasard aurait pu donner un

Tableau 11 : Méthodes utilisées pour la reconstruction d'arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires

METHODE	SEQUENCES	AVANTAGES	INCONVENIENTS	REMARQUES
Méthodes fondées sur les distances génétiques (UPGMA et NJ)	Très proches	Rapides Faciles à mettre en œuvre	Tous les sites sont traités de manière équivalente, d'où une perte d'informations Non applicables à des séquences éloignées	NJ meilleur qu'UPGMA car autorise des taux de mutations différents le long des branches Possibilité d'introduire des corrections
Méthodes fondées sur les caractères (Parcimonie)	Relativement éloignées	Evaluation de différents arbres Informations sur les séquences ancestrales	Lenteur d'exécution Inutilisable avec un grand nombre de séquences	Obtention de plusieurs arbres équivalents d'où difficultés pour faire un choix de l'un par rapport aux autres
Méthodes fondées sur les caractères (Maximum de vraisemblance)	Très éloignées	Robustes taux de transitions/ transversions différents Estimation de la longueur des branches de l'arbre final	Lenteur d'exécution Inutilisable avec un grand nombre de séquences	

NJ : Neighbor Joining ; UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

échantillon différent. Le "bootstrap" revient à créer des échantillons différents en tirant au hasard (avec remise) n sites parmi tous les sites, certains seront représentés une ou plusieurs fois, d'autres ne seront pas représentés. Si l'organisation des individus est forte, on doit retrouver pour chaque tirage un arbre proche. Dans le cas contraire, on peut douter de la structure exhibée (Perrier, communication orale).

3.3.2. Permutation

Cette méthode introduite en 1990 est basée sur la permutation des valeurs de chaque colonne de la matrice. Cela produit ainsi des matrices ayant le même nombre de colonnes, les mêmes caractères mais qui n'ont plus de structure taxonomique. On calcule un indice de ressemblance entre un arbre produit et l'arbre initial. On conclura sur une réelle structure taxonomique si la ressemblance entre l'arbre initiale et les arbres permuts est bien plus faible que pour les arbres permuts entre eux.

3.4. Enracinement d'un arbre

Les méthodes de construction phylogénétique aboutissent le plus souvent à des arbres non enracinés. Pour enraciner un arbre, on peut ajouter une séquence ("outgroup") dont on sait qu'elle est beaucoup plus éloignée de toutes les autres séquences (Anonyme, 2001). Cependant, il ne faut pas que cette séquence soit 1/trop éloignée des autres données car cela peut conduire à des erreurs dans la topologie de l'arbre, 2/trop proche des séquences. Cette séquence "outgroup" n'existe pas toujours et la racine peut alors être positionnée approximativement à égale distance de toutes les séquences.

3.5. Conclusion

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques (Tableau 11) et l'étude de la phylogénie est un vaste domaine. Quelle que soit la méthode utilisée, des hypothèses très simplificatrices sont faites sur l'évolution biologique des séquences. Actuellement, pour construire une bonne phylogénie, la qualité et le nombre des données induisent plus de variations au sein d'un arbre qu'un changement de méthode. Il faut aussi noter que plus on introduit de paramètres, plus le calcul sera long et plus il y aura une accumulation de petites erreurs : il est donc préférable d'utiliser un modèle simple. Chaque critère est optimal dans le cadre d'un certain modèle et chaque modèle a sa propre légitimité biologique. Chacun d'eux répond à une approche particulière et joue un rôle complémentaire dans l'analyse phylogénétique (Caraux *et al.*, 1995).

Pour construire des arbres phylogénétiques représentatifs de la réalité, il faut donc : 1/ avoir le plus grand nombre de gènes homologues possibles, 2/ aligner les séquences très soigneusement, 3/ éliminer les régions ambiguës, les régions hyper-variables et les gaps d'alignements, 4/ utiliser si possible plusieurs méthodes de construction et 5/ évaluer l'arbre statistiquement ("bootstrapping").

Lorsque plusieurs gènes sont considérés, les arbres obtenus sont souvent différents. Ce résultat a plusieurs causes : 1/ tous les gènes n'ont pas la même vitesse d'évolution, 2/ l'évolution est convergente, 3/ des phénomènes de recombinaison et de transferts de gènes ont lieu, et 4/ une confusion entre gènes paralogues (duplication au sein d'une espèce) et gènes orthologues (même gène dans des espèces différentes) est possible (Caraux *et al.*, 1995). Des méthodes de consensus permettent de rechercher les structures communes montrées par ces différents gènes.

Tableau 12 : Origine des différents isolats de SCYLV utilisés lors de l'étude de variabilité génétique et résultats d'amplification par RT-PCR avec différents couples d'amorces

Isolat	Origine	Cultivar de canne à sucre	Amplification à l'aide des amorces				
			YLS 111 YLS 462	ORF1START 160R.640R	OFM 323 OFM 359	OFM 336 OFM 361	104R.613R 3'PRIME2
BRA1	Brésil	SP83-5073	+	+	+	+	+
BRA2	Brésil	RB835054	+	+	+	+	-
BRB1	Barbade	B86776	+	-	+	+	-
CHN1	Chine	CYZ71/95	+	-	+	+	-
CHN2	Chine	CMT70/611	+	-	+	-	-
COL1	Colombie	CC84-75	+	-	-	-	-
COL2	Colombie	CC85-962	+	+	+	-	-
COL3	Colombie	CC87-505	+	-	+	-	-
COL4	Colombie	SP71-6163	+	+	+	+	+
CUB1	Cuba	JA64-11	+	+	+	+	-
CUB2	Cuba	C13-281	+	+	+	+	-
LKA1	Sri-lanka	SLC9225	+	-	+	+	-
MTQ1	Martinique	FR91485	+	-	+	+	-
MTQ2	Martinique	FR91816	+	-	+	+	-
MUS1	Maurice	M99/48	+	+	+	+	-
MYS1	Malaisie	TC4	+	+	+	+	+
PER1	Pérou	H32-8560	+	+	+	+	+
PHL1	Philippines	VMC76-16	+	+	+	+	+
PHL2	Philippines	VMC71-0039	+	-	+	+	-
REU0	Réunion	R83-1592	+	+	+	+	-
SEN1	Sénégal	NA63-90	+	+	+	+	-
TWN1	Taiwan	ROC6	+	-	+	+	-
USA1	Floride	TCP87-3388	-	-	+	-	-
USA2	Floride	CP851491	+	+	+	+	-
REU1	Réunion Le Gol	R570	+	+	-	+	+
REU2	Réunion Le Gol	R577	+	+	+	+	+
REU3	Réunion Le Gol	R577	+	+	+	+	+
REU4	Réunion Le Gol	R570	+	+	-	+	-
REU5	Réunion Vue-Belle	M1371/79	+	+	-	+	-
REU6	Réunion Vue-Belle	CP70-1133	+	-	-	+	-
REU7	Réunion Vue-Belle	CP70-1133	+	+	-	+	-
REU8	Réunion Vue-Belle	R575	+	+	-	+	-
REU9	Réunion Vue-Belle	R575	+	+	+	+	+
REU10	Réunion Vue-Belle	R578	+	-	-	+	-
REU11	Réunion Vue-Belle	R573	+	+	-	+	-
REU12	Réunion Vue-Belle	R569	+	+	+	+	+
REU13	Réunion Vue-Belle	M1371/79	+	+	+	+	+
REU14	Réunion Vue-Belle	R578	+	-	-	+	-
REU15	Réunion St-Benoît	R579	+	+	+	+	-
REU16	Réunion St-Benoît	R570	+	+	-	+	-
REU17	Réunion St-Benoît	R576	+	+	+	+	-
REU18	Réunion St-Benoît	R575	+	+	+	+	+
REU19	Réunion St-Benoît	R576	+	+	+	+	-
REU20	Réunion St-Benoît	R579	+	+	+	+	-
REU21	Réunion Savanna	R579	+	+	+	+	-
REU22	Réunion St-Benoît	R570	+	+	+	+	-

+ : positif en RT-PCR, - : négatif en RT-PCR, en grisé : séquences nucléotidiques exploitable

Tableau 12 (suite et fin) : Origine des différents isolats de SCYLV utilisés lors de l'étude de variabilité génétique et résultats d'amplification par RT-PCR avec différents couples d'amorces

Isolat	Origine	Cultivar de canne à sucre	Amplification à l'aide des amorces				
			YLS 111 YLS 462	ORF1START 160R.640R	OFM 323 OFM 359	OFM 336 OFM 361	104R.613R 3'PRIME2
REU23	Réunion Savanna	R579	+	+	-	+	-
REU24	Réunion St-Benoît	R575	+	+	+	+	-
REU25	Réunion Savanna	R570	+	+	-	+	-
REU26	Réunion Savanna	R575	+	+	+	+	+
REU27	Réunion Savanna	R570	+	-	-	+	-
REU28	Réunion La Mare	R490	+	-	+	+	-
REU29	Réunion La Mare	R81-0834	+	+	+	+	-
REU30	Réunion Savanna	R575	+	+	+	+	+
REU31	Réunion La Mare	AY7	+	+	+	+	+
REU32	Réunion La Mare	R579	+	+	+	+	-
REU33	Réunion La Mare	R490	+	+	+	+	-
REU34	Réunion La Mare	R570	+	+	+	+	-
REU35	Réunion Vue-Belle	R577	+	+	+	+	+
REU36	Réunion La Mare	R575	+	-	-	+	-
REU37	Réunion La Mare	R81-0834	+	+	+	+	-
REU38	Réunion La Mare	R575	+	+	+	+	-
REU39	Réunion La Mare	AY7	+	+	+	+	-
REU40	Réunion La Mare	SP71-6163	+	+	+	+	+
REU41	Réunion La Mare	R490	+	+	+	+	-
REU42	Réunion La Mare	SP71-6163	+	+	+	+	+
REU43	Réunion La Mare	R575	+	+	+	+	-
REU44	Réunion Vue-Belle	R577	+	+	-	+	-
REU45	Réunion La Mare	R579	+	+	+	+	-
REU46	Réunion La Mare	S17	+	+	+	+	-
REU47	Réunion La Mare	R570	+	+	+	+	-
REU48	Réunion La Mare	S17	+	+	+	-	-

+ : positif en RT-PCR, - : négatif en RT-PCR, en grisé : séquences nucléotidiques exploitable

Tableau 13 : Couples d'amorces utilisés pour l'étude de diversité génétique du SCYLV et leurs paramètres d'utilisation

Amorces	RT-PCR	Cycle	Taille attendue du fragment générée		
OFM359/ OFM323	Eau stérile Tampon RT-PCR (5 X) Solution dTT (100 mM) Rnase inhibiteur (40 U/µl) dNTP's (10 mM) OFM359 (100 µM) OFM323 (100 µM) Enzymes Titan ARN	16.8 µl 5 µl 1.25 µl 0.25 µl 0.5 µl 0.1 µl 0.1 µl 0.5 µl 0.5 µl	50°C/60 min 94°C/2 min 94°C/15 sec 52°C/2 min 68°C/2 min 94°C/15 sec 52°C/2 min 68°C/10 min 15°C	x30	1211 pb
ORF1START/ 160R.640R	Eau stérile Tampon RT-PCR (5 X) Solution dTT (100 mM) Rnase inhibiteur (40 U/µl) dNTP's (10 mM) ORF1 START (100 µM) 160R.640R (100 µM) Enzymes Titan ARN	16.9 µl 5 µl 1.25 µl 0.25 µl 0.5 µl 0.05 µl 0.05 µl 0.5 µl 0.5 µl	54°C/60 min 94°C/2 min 94°C/15 sec 61°C/2 min 68°C/2 min 94°C/15 sec 61°C/2 min 68°C/10 min 15°C	x30	1620 pb
OFM336/ OFM361	Eau stérile Tampon RT-PCR (5 X) Solution dTT (100 mM) Rnase inhibiteur (40 U/µl) dNTP's (10 mM) OFM336 (100 µM) OFM361 (100 µM) Enzymes Titan ARN	16.8 µl 5 µl 1.25 µl 0.25 µl 0.5 µl 0.1 µl 0.1 µl 0.5 µl 0.5 µl	53°C/60 min 94°C/2 min 94°C/15 sec 59°C/2 min 68°C/2 min 94°C/15 sec 59°C/2 min 68°C/10 min 15°C	x30	658 pb
104R.613R/ 3'PRIME2REV	Eau stérile Tampon RT-PCR (5 X) Solution dTT (100 mM) Rnase inhibiteur (40 U/µl) dNTP's (10 mM) 104R.613R (100 µM) 3'PRIME2REV (100 µM) Enzymes Titan ARN	16.9 µl 5 µl 1.25 µl 0.25 µl 0.5 µl 0.05 µl 0.05 µl 0.5 µl 0.5 µl	50°C/60 min 94°C/2 min 94°C/30 sec 59°C/30 sec 68°C/45 sec 94°C/30 sec 59°C/30 sec 68°C/10 min 15°C	x40	1299 pb

4. Matériel et méthodes

4.1. Matériel

Quarante huit échantillons de canne à sucre infectée par le SCYLV (détecté par IE) et représentatifs de La Réunion (15 cultivars issus de 5 localités) ont été utilisés pour l'étude de la diversité génétique de l'agent pathogène sur l'île. Les 24 échantillons originaires d'autres zones géographiques (24 cultivars issus de 14 pays) et également infectés par le SCYLV (détecté par IE et RT-PCR) étaient issus de la quarantaine de canne à sucre du CIRAD à Montpellier (Tableau 12).

4.2. Méthodes

4.2.1. Extraction d'ARN

L'extraction de l'ARN total a été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plant (QIAGEN) qui comporte un ensemble de colonnes à centrifuger (RNeasy®, QIAshredder™) et des tampons de lyse (RTL) et de lavage (RW1, RPE).

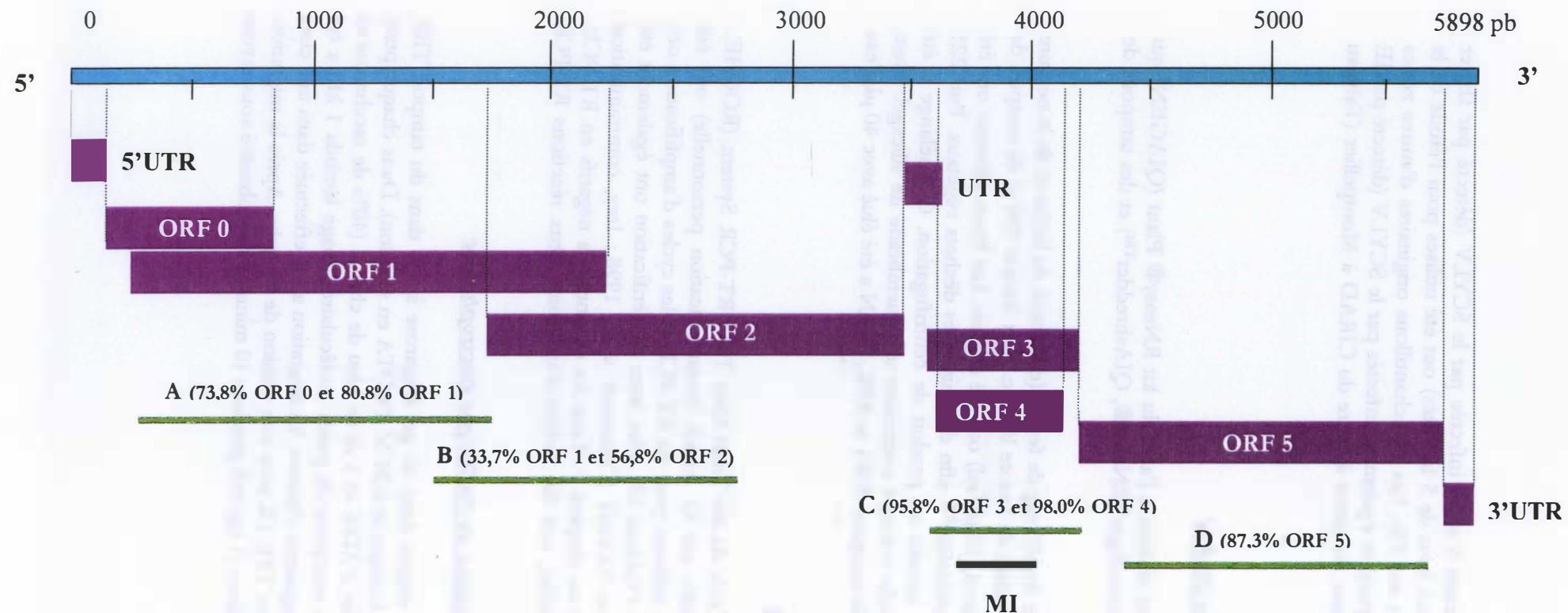
L'ARN total a été extrait à partir de 100 mg de feuille (extrémité du limbe et de la nervure centrale) broyés dans des mortiers contenant de l'azote liquide. A ce broyat 450 µl de tampon de lyse RLT contenant du β-mercaptopropanoïd (10 µl/ml) ont été ajoutés. Les lysats obtenus ont été centrifugés à travers une colonne QIAshredder™ afin d'éliminer les déchets végétaux. Puis 225 µl d'éthanol froid (96-100%) ont été ajoutés au produit de centrifugation. Ce mélange a été introduit et centrifugé dans une nouvelle colonne contenant une membrane de silicagel fixant l'ARN. Après des lavages avec 500 µl de tampons RW1 et RPE, l'ARN a été élué avec 40 µl d'eau garantie sans RNase.

4.2.2. RT-PCR

La RT-PCR a été réalisée à l'aide du kit Titan One Tube RT-PCR System (ROCHE). Quatre couple d'amorces recommandés par G. Smith (communication personnelle) ont été utilisés. Les concentrations de réactifs utilisées pour les RT-PCR et les cycles d'amplification ont varié selon le couple d'amorce utilisé (Tableau 13). Des tests de vérification ont également été effectués avec les amorces YLS111 et YLS462 (Comstock *et al.*, 1998 ; Irey, communication personnelle) selon le protocole décrit au chapitre 2. Tous les échantillons négatifs en RT-PCR, quel que soit le couple d'amorces utilisé, ont fait l'objet d'au moins deux réactions RT-PCR indépendantes.

4.2.3. Visualisation de l'ADN par électrophorèse

L'ADN amplifié a été mis à migrer dans un gel d'agarose à 1% dans du tampon TBE (0,90 M de Tris Base, 0,90 M d'acide borique et 0,20 M d'EDTA en solution). Dans chaque puits du gel ont été déposés 9 µl d'amplifiat d'ADN et 1 µl de bleu de charge (40% de saccharose et 0,25% de bleu de bromophénol). Le marqueur de poids moléculaire (phage lambda 1 kb) a été utilisé pour déterminer la taille des fragments obtenus. La migration a été effectuée dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE 1X sous une tension de 80 volts. Après la migration, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pendant 10 minutes puis observé sous rayons ultraviolets.



UTR : régions non traduites

ORF 0 : protéine inconnue (symptômes ?)

ORF 1 : protéine multifonctionnelle (sérine protéase, Vpg...)

ORF 2 : ARN polymérase ARN-dépendante

ORF 3 : protéine de capside

ORF 4 : protéine de mouvement

ORF 5 : protéine de translecture

A : fragment de 1620 pb généré par le couple d'amorces A1 et A2

B : fragment de 1211 pb généré par le couple d'amorces B1 et B2

C : fragment de 685 pb généré par le couple d'amorces C1 et C2

D : fragment de 1299 pb généré par le couple d'amorces D1 et D2

MI : fragment de 352 pb généré par le couple d'amorces YLS 462 et YLS111

Figure 21 : Organisation du génome du SCYLV et position des fragments générés par RT-PCR pour l'étude de la diversité génétique du virus

Tableau 14 : Caractéristiques des amorces utilisées en RT-PCR

Nom des amorces	Code du fragment amplifié	Position des amorces	Séquence 5'-3' des amorces	Source
YLS111 FORWARD	YLS	confidentielle	confidentielle	Irey M. (communication personnelle)
YLS462 REVERSE		confidentielle	confidentielle	Irey M. (communication personnelle)
ORF1 START FORWARD	A	confidentielle	confidentielle	Smith G. et Borg Z. (communication personnelle)
160R.640R REVERSE		confidentielle	confidentielle	Smith G. et Borg Z. (communication personnelle)
OFM 323 FORWARD	B	1518-1534	CAGACATTGCTGATTAC	Moonan et Mirkov, 2001
OFM 359 REVERSE		2729-2711	GCTCTCCACAAAGCTATCT	Moonan et Mirkov, 2001
OFM 336 FORWARD	C	confidentielle	confidentielle	Moonan et Mirkov, 2001
OFM 361 REVERSE		4352-4334	TGTTTCACGATGTGGTTC	Moonan et Mirkov, 2001
104R.613R FORWARD	D	confidentielle	confidentielle	Smith G. et Borg Z. (communication personnelle)
3'PRIME2 REVERSE		confidentielle	confidentielle	Smith G. et Borg Z. (communication personnelle)

72 isolats de SCYLV
(48 isolats de La Réunion et 24 isolats d'origines diverses)



72/72 (100%) positifs en sérologie
(IE sur feuille F1)



71/72 (99%) positifs en RT-PCR
(amorces YLS 111 et YLS 462)
un échantillon négatif même après dilution de l'ARN au 1/10^c



RT-PCR avec 4 autres couples d'amorces

Nombre d'amplification	Fragment			
	A	B	C	D
Nombre d'amplification	55/72 (76%)	56/72 (78%)	66/72 (92%)	18/72 (25%)
Nombre de séquences exploitables	33/55 (60%)	47/56 (84%)	24/66 (36%)	10/18 (56%)

Figure 22 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors des différentes étapes de détection du SCYLV par IE et RT-PCR

Tableau 15 : Séquences obtenues sur Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) et utilisées lors des analyses phylogénétiques

Isolat de SCYLV	Numéro d'accession	Cultivar de canne à sucre hôte	Origine	Séquence disponible pour le fragment			
				A	B	C	D
SCYLV-A	AF157029	CP65-357 (Moonan <i>et al.</i> , 2001)	Floride USA	oui	oui	oui	oui
C1	AF369927	SP71-6163 (Moonan et Mirkov, 2001)	Cali Colombie	oui	non	oui	non
C3	AF369928	CC85-96 (Moonan et Mirkov, 2001)	Cali Colombie	oui	non	oui	non
C4	AF369929	CC84-75 (Moonan et Mirkov, 2001)	Cali Colombie	oui	non	oui	non
N6	AF369926	Q136 (Moonan et Mirkov, 2001)	Santa-Rosa Argentine	oui	non	oui	non
B1	AF369925	SP71-6163 (Moonan et Mirkov, 2001)	Sao-Paulo Brésil	oui	non	oui	non
L1	AF369923	LHo83-153 (Moonan et Mirkov, 2001)	Bâton-Rouge USA	non	non	non	non
G2	AF369924	CP92-1654 (Moonan et Mirkov, 2001)	Santa Lucia Guatemala	oui	non	oui	non
maia	AF141385	SP71-6163 (Maia <i>et al.</i> , 2000)	Sao-Paulo Brésil	non	non	oui	non

4.2.4. Clonage et séquençage

Les produits d'amplification PCR (3 µl) ont été ligaturés dans le vecteur pGEM®-T Easy Vector (Promega) pendant une nuit à 14°C. Les plasmides recombinants ont été introduits dans 100 µl de bactéries compétentes d'*Escherichia coli* (souche DH5α) par transformation (choc thermique à 37°C pendant 90 secondes puis 4°C pendant 30 minutes). Les bactéries ont ensuite été remises en culture dans 400 µl de milieu LB (Annexe 3) pendant 1h à 37°C. Un aliquot (100 µl) de la culture a été étalé sur un milieu sélectif solide [LB + ampicilline (1 µl/ml)] en boîte de Petri et celle-ci a été mise à incuber pendant une nuit à 37°C. Les colonies transformées ont ensuite été criblées par PCR avec les amores ayant servi à la RT-PCR et seules les colonies contenant les inserts ont été conservées. L'ADN plasmidique a été extrait à l'aide du kit QIAprep® Spin de QIAGEN et visualisé sur un gel d'agarose à 1% suivant le protocole décrit précédemment (4.2.3.). Un des plasmides contenant le fragment de bonne taille a été séquençé pour chaque isolat par Génome Express (Grenoble, France), en utilisant la technique ABI Perkin-Elmer Sequencer et la Taq dideoxy terminator, selon le protocole du fabricant. Les amores universelles utilisées lors du séquençage étaient pUC/M13 Forward et pUC/M13 Reverse pour tous les fragments. Cependant, pour le fragment B, des amores internes ont été dessinées afin de pouvoir séquençer l'ensemble du fragment. Le séquençage n'a été fait qu'une seule fois sur un seul brin, mais dans les deux sens lorsque les deux amores se rejoignaient dans la partie centrale des fragments. Les séquences d'acides nucléotidiques ont ensuite été nettoyées et alignées à l'aide du logiciel Vector NTI (Informax, Bethesda, USA). Le même travail a été effectué avec les séquences nucléotidiques traduites en acides aminés correspondant aux différentes protéines du SCYLV.

4.2.5. Analyse phylogénétique

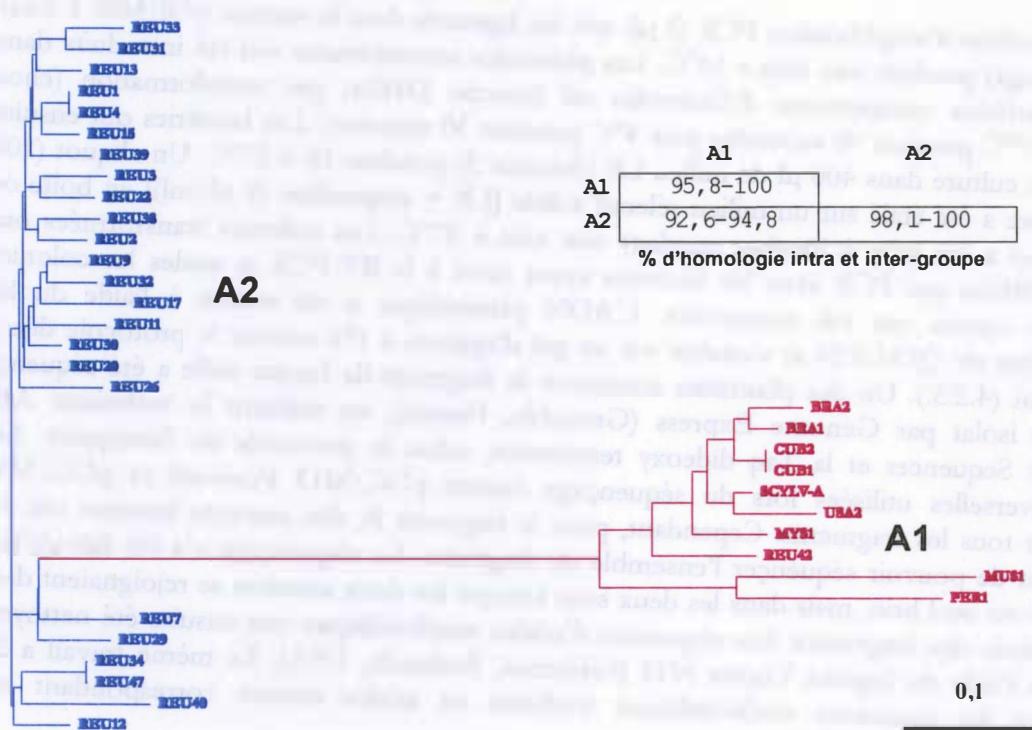
Les distances ont été calculées grâce aux modules dnadist (pour les séquences nucléotidiques) et protdist (pour les séquences en acides aminés) du logiciel PHYLIP 3.57 (<http://bioweb.pasteur.fr>), avec une correction selon la méthode Jukes-Cantor. Les arbres ont ensuite été réalisés avec la méthode NJ du logiciel DARWIN (Perrier et Flori, 1999).

5. Résultats

5.1. Amplifications partielles du génome de divers isolats de SCYLV

Cinq couples d'amores ont été utilisés pour amplifier différentes parties du génome des 72 isolats de SCYLV (Figure 21 et tableau 14). La présence du SCYLV dans tous les échantillons foliaires avant l'extraction de l'ARN viral a été vérifiée par IE sur feuille F1 (Figure 22). Un produit d'amplification a été obtenu avec les amores YLS111 et YLS462 (Comstock *et al.*, 1998 ; Irey, communication personnelle) pour tous les isolats à l'exception de l'isolat USA1 (Tableau 12). Ce couple d'amores est situé dans la partie du génome codant pour la protéine de capsid (Figure 21) et a été dessiné par Mike Irey (Irey, communication personnelle). Les quatre autres couples d'amores amplifiant les fragments appelés A, B, C et D ont été dessinés par les équipes de Smith et de Mirkov (Moonan et Mirkov, 2001 ; Smith, communication personnelle). Les fragments A (correspondant aux ORFs 0 et 1 partiels), B (correspondant aux ORFs 1 et 2 partiels), C (correspondant aux ORFs 3 et 4) et D (correspondant à l'ORF 5 partiel) ont été amplifiés pour respectivement 55 (76%), 56 (78%), 66 (92%) et 18 (25%) isolats (Figure 22). Tous les amplifiats obtenus ont été clonés et la majorité d'entre eux a été séquençée. Des séquences exploitables pour l'étude de la diversité ont été obtenues pour 33 isolats sur 55 pour le fragment A, 47 isolats sur 56 pour le fragment B et 10 isolats sur 18 pour le fragment D. Pour le fragment C, seulement 24 séquences ont été exploitées sur les 66 car il a été supposé que la protéine de

Fragment A



Fragment B

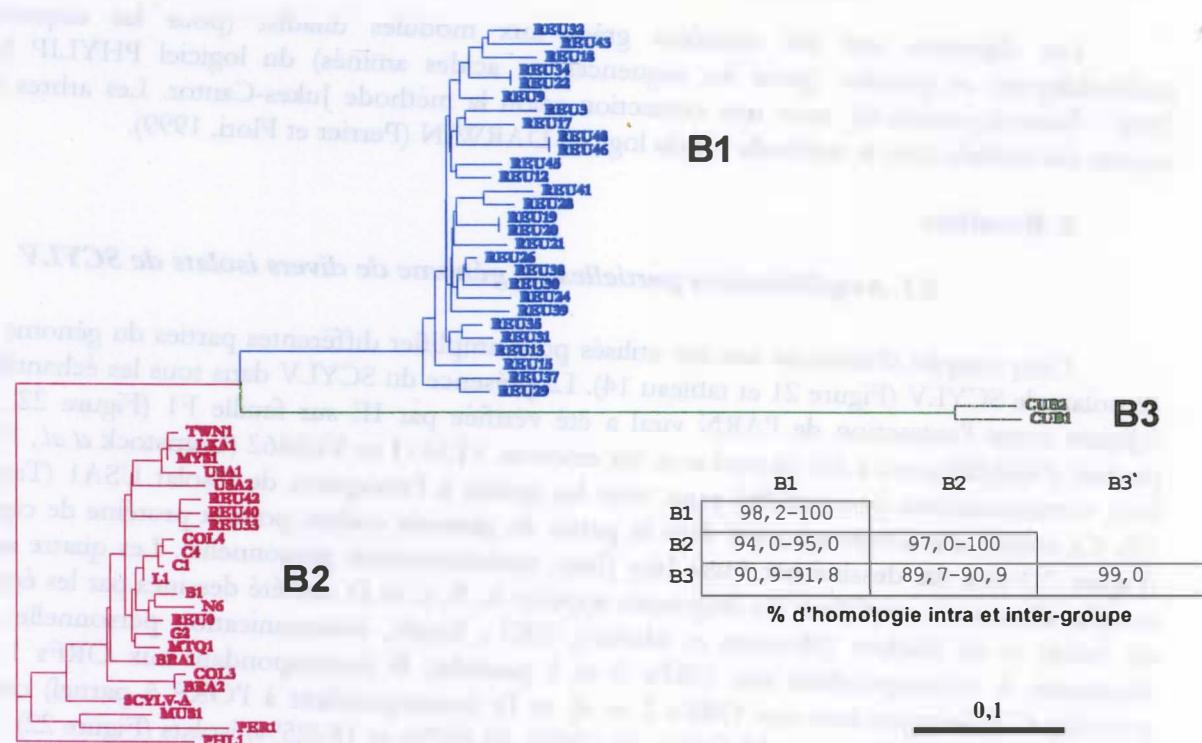


Figure 23 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir des fragments nucléotidiques A (en haut) et B (en bas)

ORF 2 partiel en nucléotides (fragment B partiel)

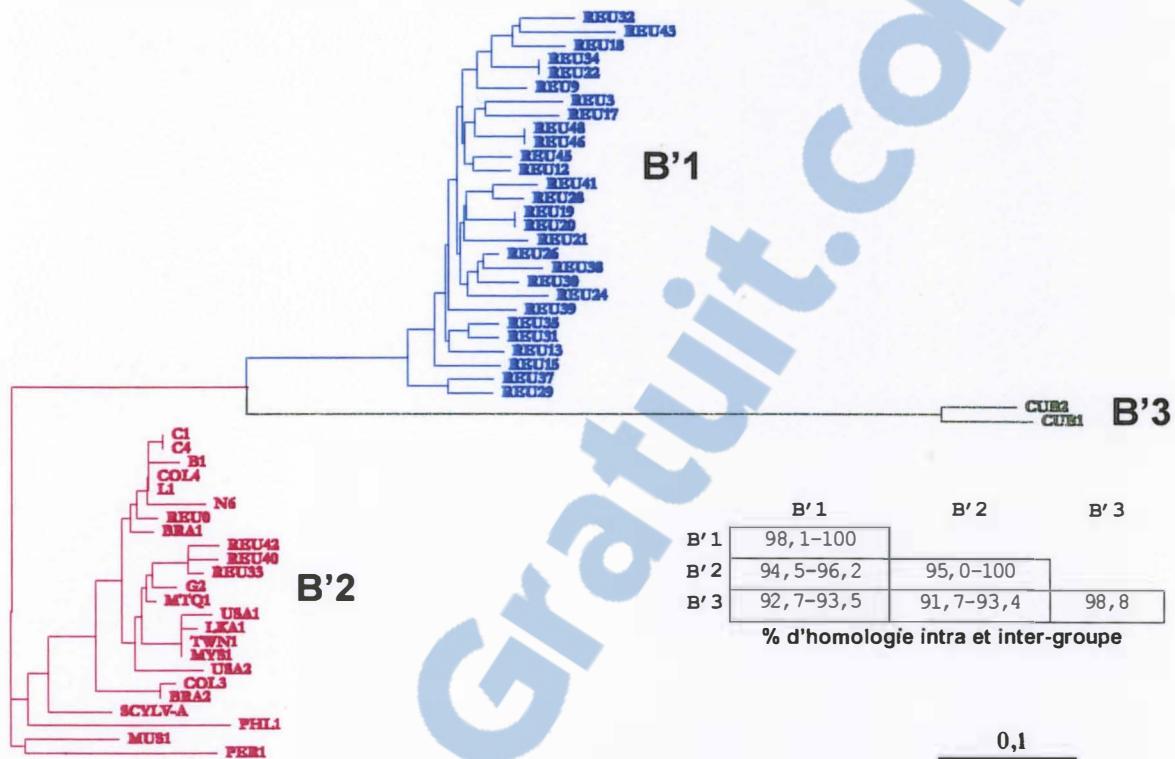


Figure 24 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir du fragment nucléotidique B partiel correspondant à l'ORF 2 partiel

capside est une partie du génome très conservée chez les *Luteoviridae* (Mayo et Miller, 1999) et il a été préféré de privilégier les autres parties du génome. De plus, une zone de 20 nucléotides de l'ORF 3 codant pour la protéine de capside n'a pas pu être séquencée pour des raisons inconnues. En conséquence, seule une partie du fragment C (85%) a été utilisée pour les analyses phylogénétiques. Un certain nombre de fragments A, B et D n'ont pas pu être séquencés de façon satisfaisante pour diverses raisons : clonage infructueux, perte du signal au séquençage...

Une recherche sur la banque de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) a aussi permis de répertorier neuf séquences d'autres isolats de SCYLV. Seules les séquences correspondant aux fragments A, B, C et D ont été retenues (Tableau 15). Parmi celles-ci, la séquence de l'isolat C3 de Colombie (numéro d'accession AF369928) n'a finalement pas été exploitée car elle contenait un trop grand nombre d'incertitudes (125 pb sur 2835). Les séquences des autres *Luteoviridae* correspondant aux fragments A, B, C et D étaient généralement trop différentes de celles des isolats de SCYLV et, sauf exception, n'ont pas été incluses dans les constructions d'arbres phylogénétiques.

5.2. Localisation des mutations

D'une manière générale, les mutations étaient réparties de manière aléatoire sur l'ensemble des régions du génome. Pour chaque fragment étudié (A, B, C et D), les mutations correspondaient à des changements de bases. Aucune zone de délétion ou d'insertion n'a été mise en évidence.

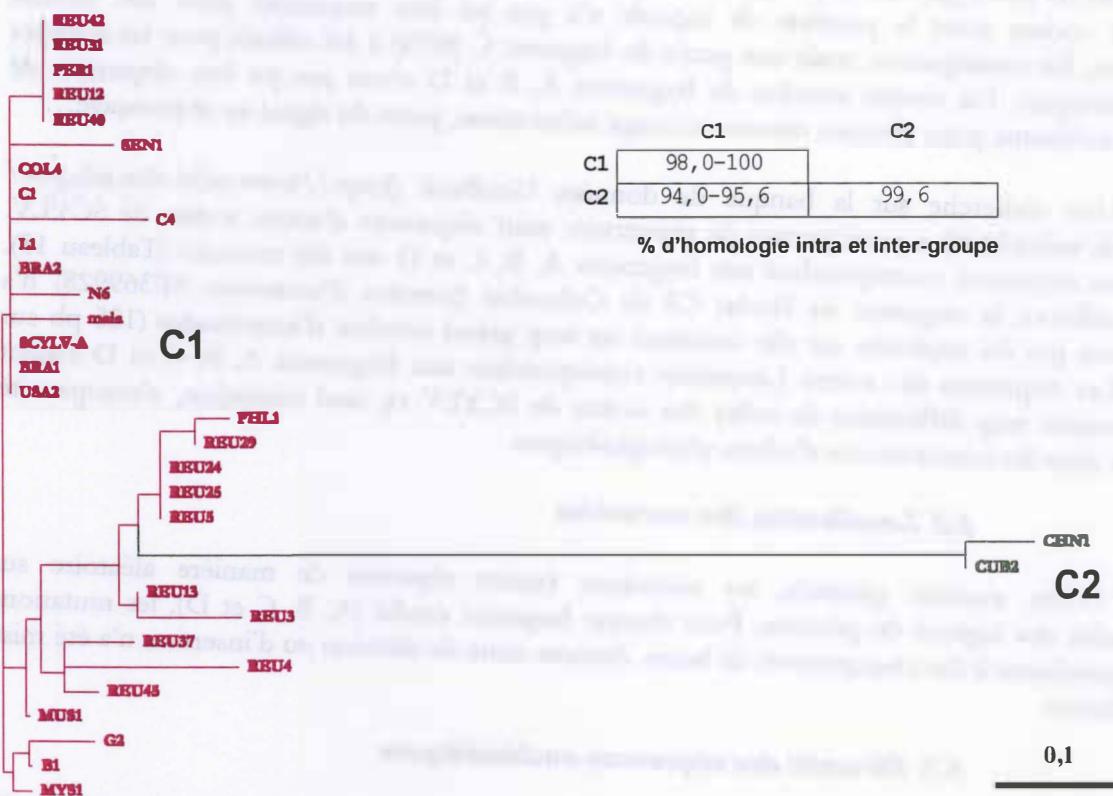
5.3. Diversité des séquences nucléotidiques

Pour le fragment A, les 34 isolats de SCYLV sont distribués en deux groupes (Figure 23) : un groupe (A1) composé de 10 individus d'origines diverses (Brésil, Cuba, Etats-Unis, Maurice, Pérou, Malaisie) dont un individu de la Réunion (REU42), et un autre groupe (A2) composé de 24 individus provenant de La Réunion. L'homologie entre les groupes A1 et A2 est supérieure à 92,6%, mais la variabilité à l'intérieur du groupe international A1 (95,8 à 100% d'homologie) est un peu plus grande que celle à l'intérieur du groupe A2 de La Réunion (98,1 à 100% d'homologie).

Pour le fragment B, les 54 isolats de SCYLV sont distribués en trois groupes (Figure 23) : un groupe B1 formé de 28 isolats, tous originaires de La Réunion ; un groupe B2 constitué de 24 isolats d'origines diverses (Colombie, Brésil, Philippines, Pérou, Maurice, Taïwan...) dont quatre de La Réunion (REU0, REU33, REU40 et REU42) ; un groupe B3 formé de seulement deux individus en provenance de Cuba (CUB1 et CUB2). La variabilité intra-groupe est relativement faible pour chacun des trois groupes (98,2 à 100% d'homologie pour B1, 97,0 à 100% d'homologie pour B2 et 99,0% d'homologie pour B3). La variabilité inter-groupe est assez élevée entre certains groupes, notamment entre B2 et B3 pour lesquels l'homologie est comprise entre 89,7 et 90,9%. Le fragment B étant constitué de la partie C terminale de l'ORF 1 et de la partie N terminale de l'ORF 2 (Figure 21), une seconde analyse phylogénétique a été réalisée avec la partie du fragment correspondant à l'ORF 2 uniquement (Figure 24). La construction phylogénétique obtenue est quasiment identique à celle obtenue pour le fragment B complet et avec des pourcentages d'homologie similaires.

Pour le fragment C, les 32 isolats de SCYLV sont distribués en deux groupes (Figure 25) : un groupe majoritaire (C1) constitué de 30 isolats originaires de La Réunion et d'autres zones géographiques (Colombie, Brésil, Etats-Unis, Maurice, Pérou, Sénégal...) et un groupe minoritaire (C2) formé de deux isolats provenant de Chine et de Cuba. Ces deux isolats sont identiques à 99,6% et les pourcentages d'homologie entre isolats du groupe C1 varient de 98,0 à

Fragment C



Fragment D

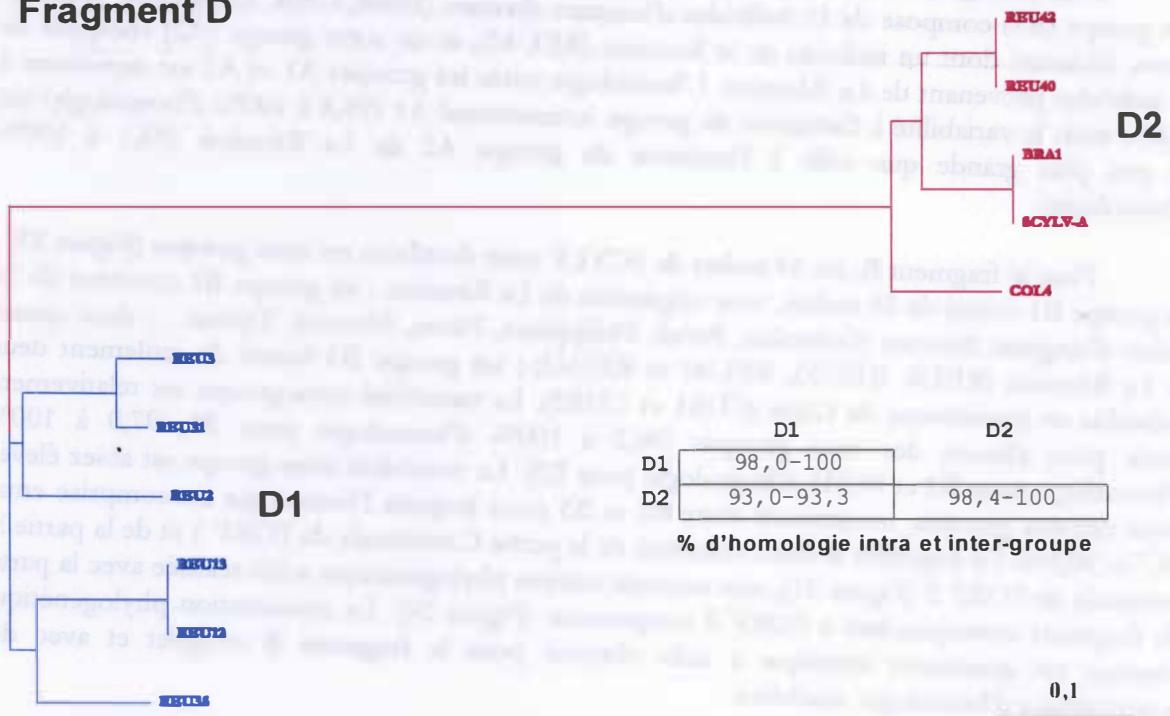
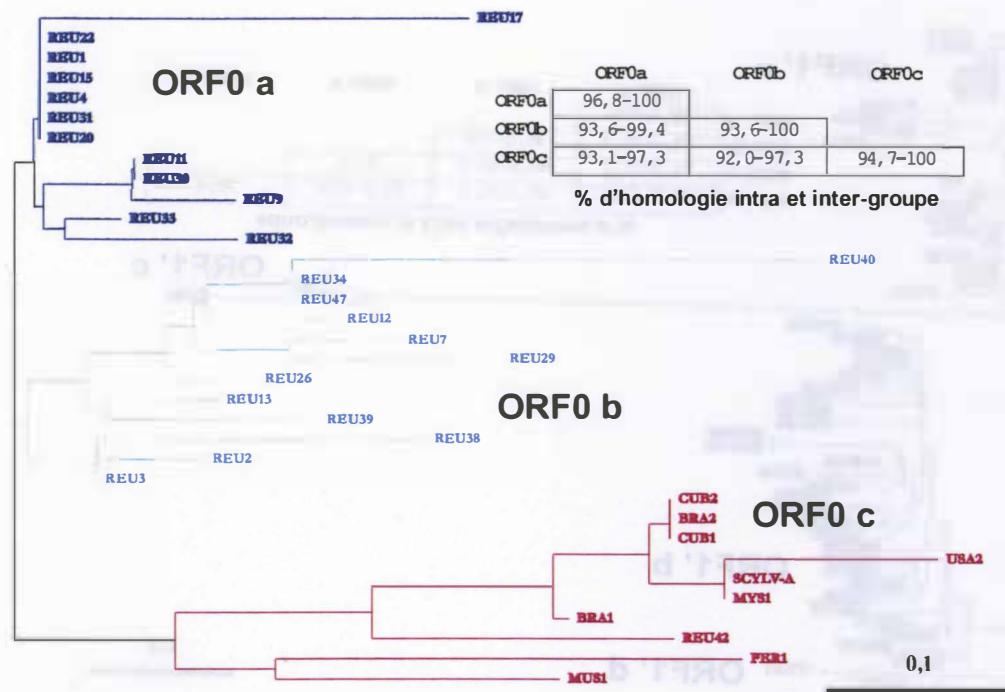


Figure 25 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir des fragments nucléotidiques C (en haut) et D (en bas)

ORF 0 partiel (séquence protéique déduite du fragment A)



ORF 1 partiel (séquence protéique déduite du fragment A)

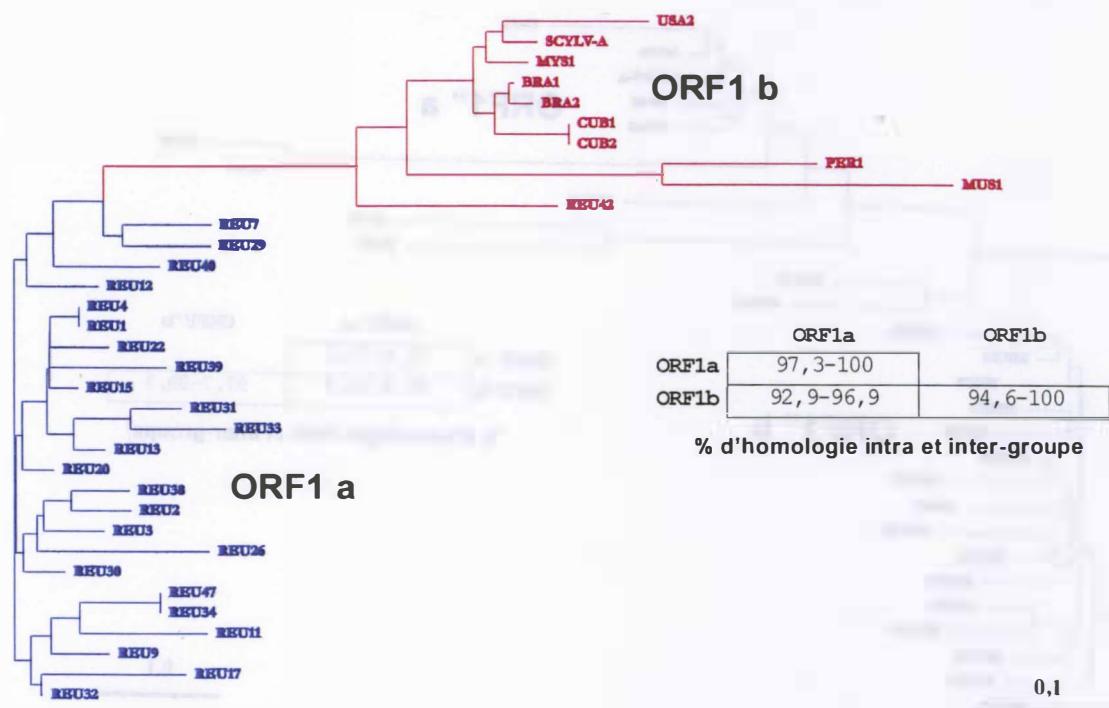
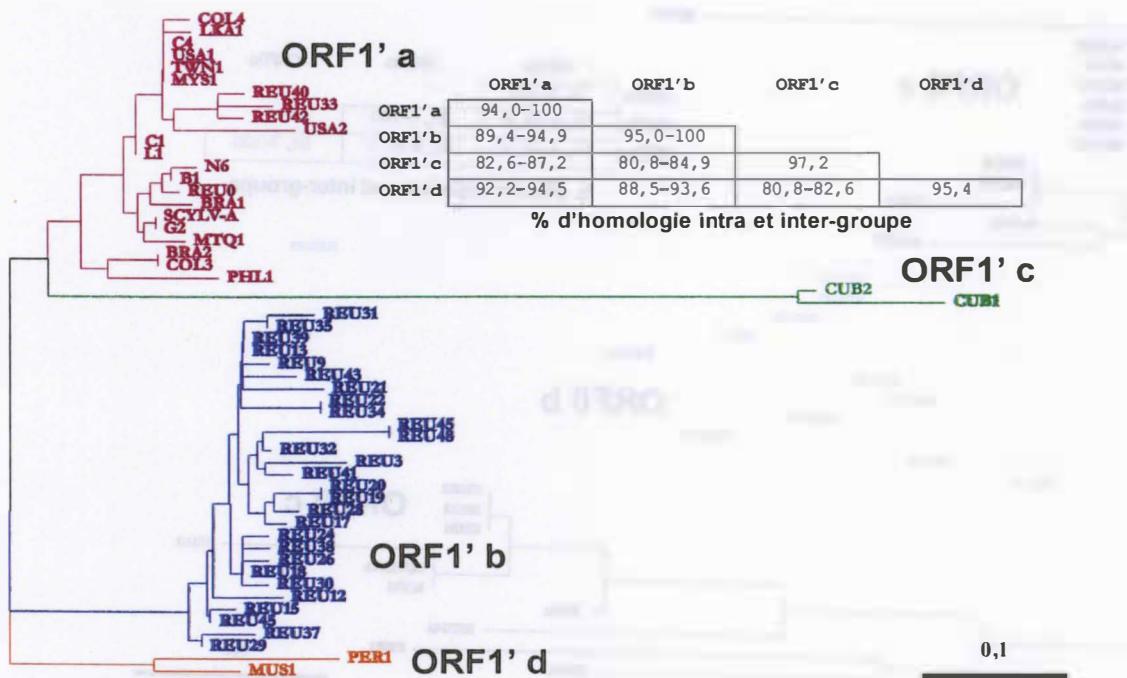


Figure 26 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir des ORFs partiels 0 (en haut) et 1 (en bas) déduits du fragment A

ORF 1 partiel (séquence protéique déduite du fragment B)



ORF 1 (séquence protéique déduite des fragments A et B)

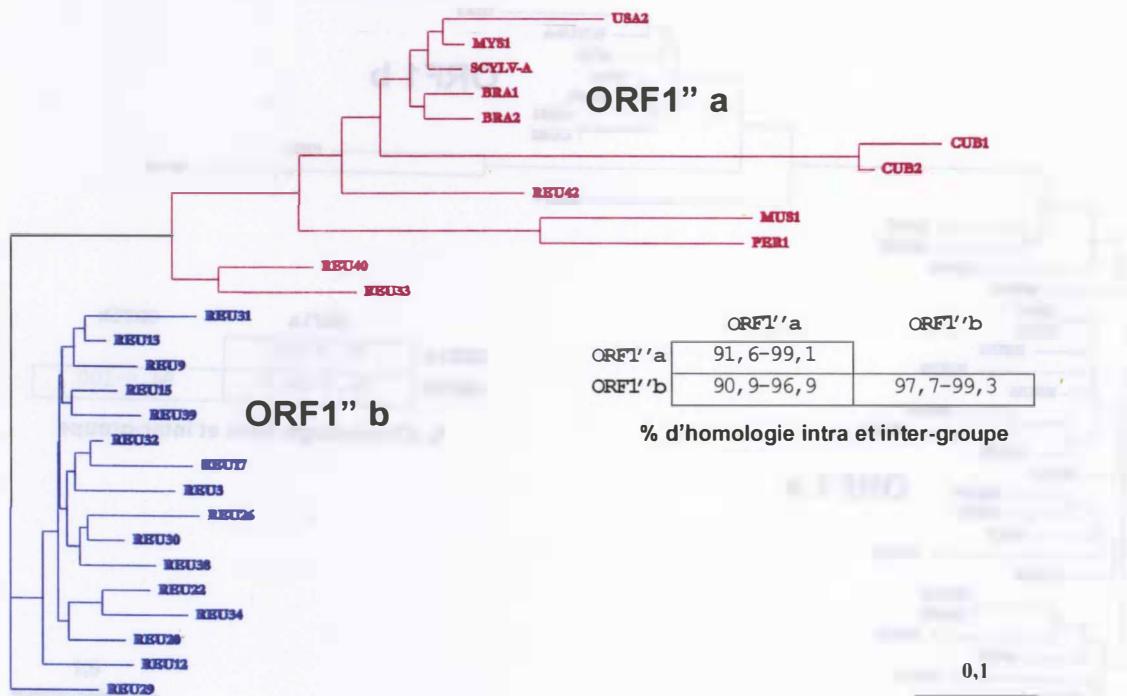


Figure 27 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir de l'ORF 1 partiel déduit du fragment B (en haut) et de l'ORF 1 déduit des fragments A et B (en bas)

100%. Plusieurs isolats du groupe C1 ont d'ailleurs des séquences totalement identiques, bien qu'étant originaires de pays différents (Colombie, Brésil, Etats-Unis).

Pour le fragment D, les 11 isolats de SCYLV sont distribués en deux groupes (Figure 25) : un groupe D1 formé de six individus de La Réunion et un groupe D2 constitué de cinq individus issus de La Réunion (REU40 et REU42), de Floride (SCYLV-A), du Brésil (BRA1) et de Colombie (COL4). La variabilité au sein du groupe D2 (98,4 à 100% d'homologie) est similaire à celle observée au sein du groupe D1 (98,0 à 100%). L'homologie entre les deux groupes varie quant à elle de 93,0 à 93,3%.

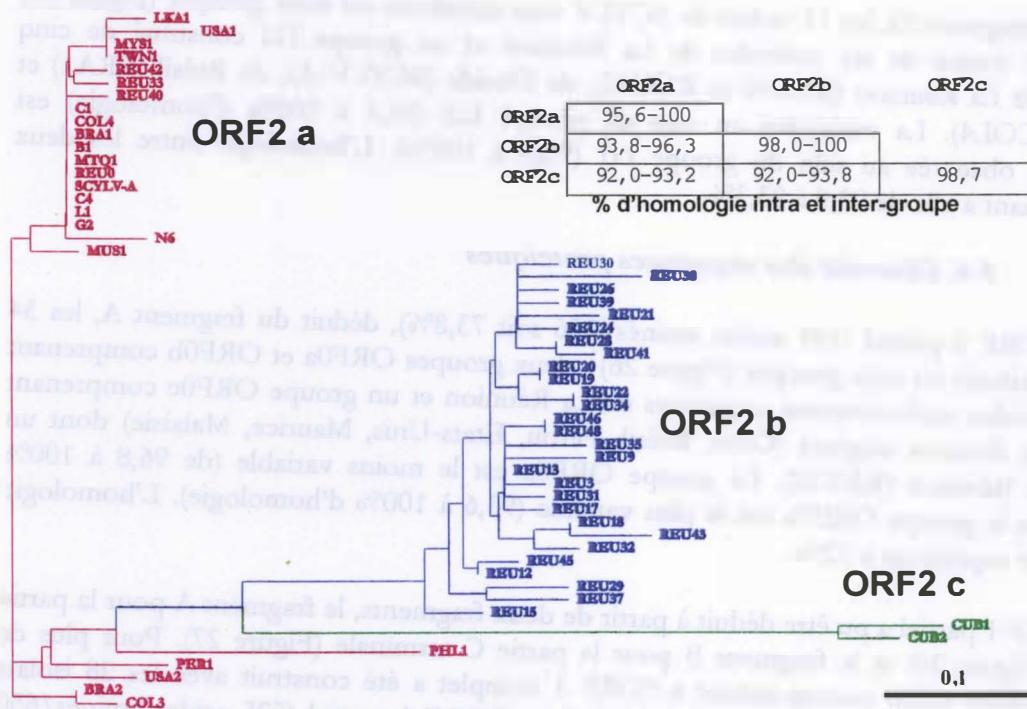
5.4. Diversité des séquences protéiques

Pour l'ORF 0 partiel (189 acides aminés/256 soit 73,8%), déduit du fragment A, les 34 isolats sont distribués en trois groupes (Figure 26) : deux groupes ORF0a et ORF0b comprenant chacun 12 individus exclusivement originaires de La Réunion et un groupe ORF0c comprenant 10 individus de diverses origines (Cuba, Brésil, Pérou, Etats-Unis, Maurice, Malaisie) dont un individu de La Réunion (REU42). Le groupe ORF0a est le moins variable (de 96,8 à 100% d'homologie) et le groupe ORF0b est le plus variable (93,6 à 100% d'homologie). L'homologie inter-groupe est supérieure à 92%.

Un ORF 1 partiel a pu être déduit à partir de deux fragments, le fragment A pour la partie N terminale (Figure 26) et le fragment B pour la partie C terminale (Figure 27). Pour plus de clarté, un troisième arbre correspondant à l'ORF 1 complet a été construit avec les 28 isolats disponibles pour les deux fragments (Figure 27). Pour l'ORF 1 partiel (525 acides aminés/650 soit 80,8%) issu du fragment A, les 34 isolats sont répartis en deux groupes : un groupe ORF1a peu variable (97,3 à 100% d'homologie) comprenant des individus qui sont tous originaires de La Réunion et un groupe plus variable (94,6 à 100% d'homologie) comprenant 10 individus originaires de différentes zones géographiques (Etats-Unis, Malaisie, Brésil, Cuba, Pérou, Maurice), dont La Réunion (REU42). La variabilité entre ces deux groupes est de 92,9 à 96,9%. Pour l'ORF 1 partiel (219 acides aminés/650 soit 33,7%) issu du fragment B, les 54 individus sont répartis en quatre groupes : un groupe ORF1'a variable (94,0 à 100% d'homologie) composé de 22 individus originaires de différentes zones géographiques (Colombie, Etats-Unis, Argentine, Brésil, Philippines...), dont La Réunion (REU0, REU33, REU40 et REU42) ; un groupe ORF1'b (95,0 à 100% d'homologie) composé de 26 individus tous originaires de La Réunion. Un groupe ORF1'c composé de deux individus originaires de Cuba (CUB1 et CUB2) et un groupe ORF1'd composé de deux individus originaires du Pérou et de Maurice (PER1 et MUS1). La variabilité inter-groupe est comprise entre 80,8 et 94,9%. Pour l'ORF 1 (642 acides aminés/650 soit 98,8%) déduit des fragments A et B, deux groupes ont été mis en évidence : un groupe ORF1'a composé de 12 individus d'origines géographiques très diverses (Réunion, Cuba, Pérou, Brésil, Maurice...) et qui est assez variable (91,6 à 99,1% d'homologie), et un groupe ORF1'b composé de 16 individus originaires de La Réunion et qui est beaucoup moins variable (97,7 à 99,3% d'homologie). Ces groupes présentent une grande variabilité inter-groupe (90,9 à 96,9% d'homologie).

Pour l'ORF 2 partiel (325 acides aminés/572 soit 56,8%), déduit du fragment B, les 54 isolats sont distribués en trois groupes (Figure 28) : un groupe ORF2a composé de 24 individus relativement variables entre eux (95,6 à 100% d'homologie) et originaires de diverses zones géographiques (Philippines, Cuba, Colombie, Etats-Unis, Sri-Lanka, La Réunion...) ; un groupe ORF2b composé de 28 individus beaucoup moins variables (98,0 à 100% d'homologie) et tous originaires de La Réunion ; et un groupe ORF2c formé de deux individus de Cuba (CUB1 et CUB2). L'homologie entre les trois groupes est supérieure à 92%.

ORF 2 partiel (séquence protéique déduite du fragment B)



ORF 3 (séquence protéique déduite du fragment C)

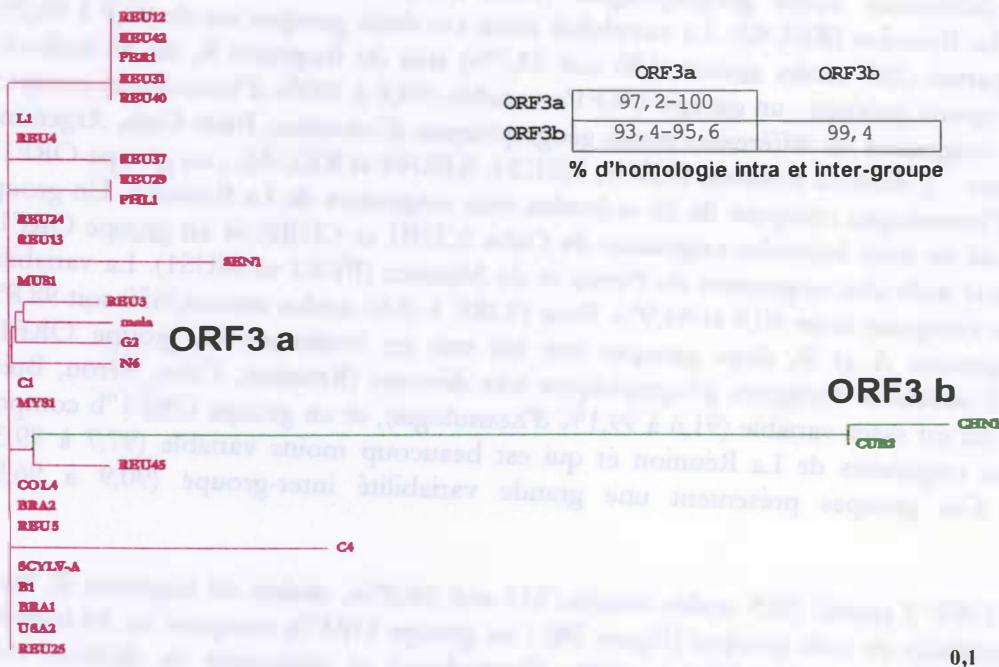
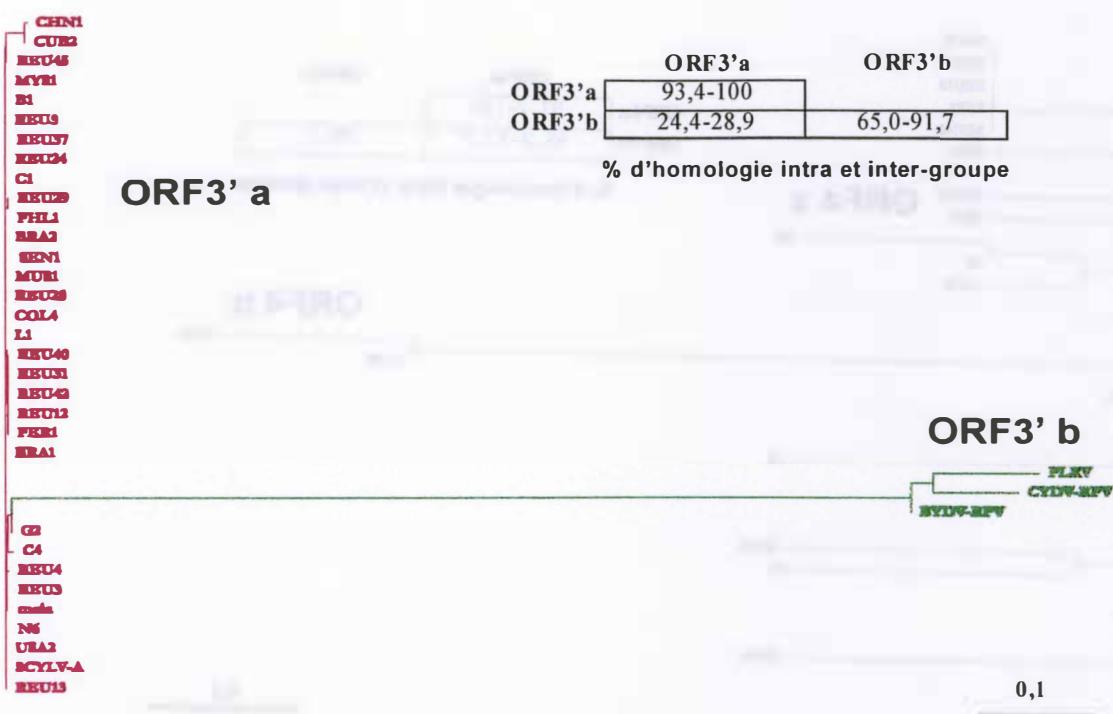


Figure 28 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir de l'ORF 2 partiel (en haut) et de l'ORF 3 (en bas)

ORF 3 (séquence protéique déduite du fragment C)



ORF 4 (séquence protéique déduite du fragment C)

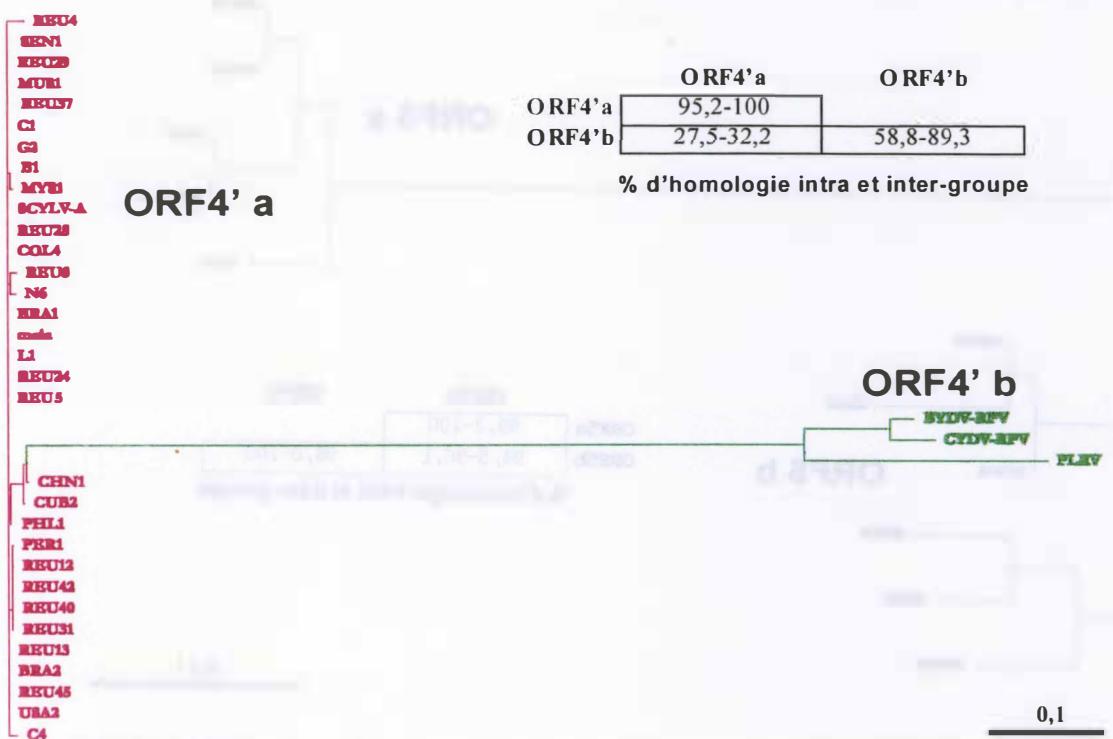
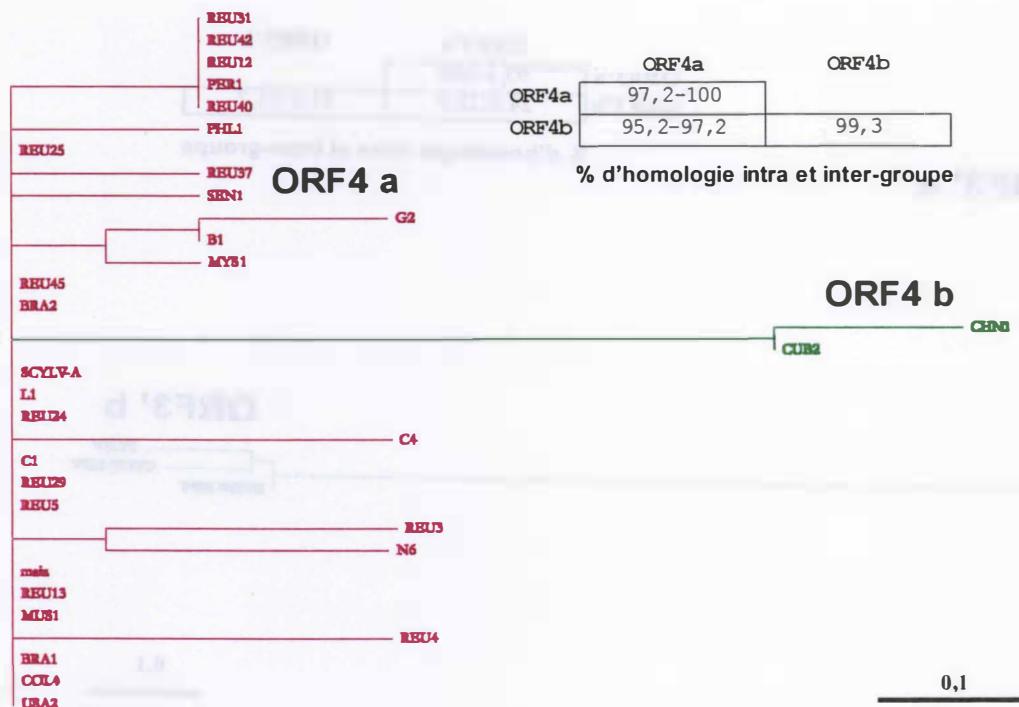


Figure 30 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV et trois Polerovirus établies à partir des ORFs 3 (en haut) et 4 (en bas)

ORF 4 (séquence protéique déduite du fragment C)



ORF 5 partiel (séquence protéique déduite du fragment D)

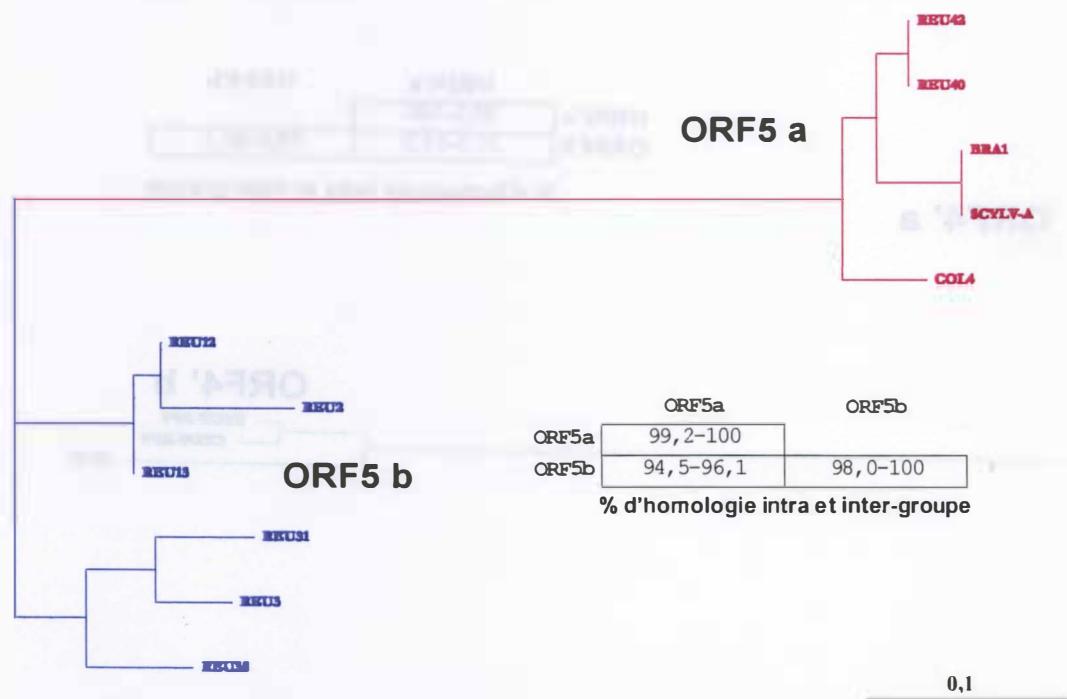


Figure 29 : Relations phylogénétiques entre différents isolats de SCYLV établies à partir de l'ORF 4 (en haut) et de l'ORF 5 partiel (en bas)

Tableau 16 : Répartition des isolats de *SCYLV* en divers groupes phylogénétiques

Isolat de <i>SCYLV</i>	Groupe phylogénétique basé sur la séquence nucléotidique du fragment				Groupe phylogénétique basé sur la séquence protéique de l'ORF partiel ou entier									Profil génétique
	A	B	C	D	0	1 (A) ^a	1 (B) ^b	1 (A et B) ^c	2	3	4	5		
BRA1	A1	B2	C1	D2	ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a	ORF5a		II
BRA2	A1	B2	C1		ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
CHN1			C2							ORF3b	ORF4b			III
COL3		B2					ORF1'a		ORF2a					II
COL4		B2	C1	D2			ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a	ORF5a		II
CUB1	A1	B3			ORF0c	ORF1b	ORF1'c	ORF1'a	ORF2c					III
CUB2	A1	B3	C2		ORF0c	ORF1b	ORF1'c	ORF1'a	ORF2c	ORF3b	ORF4b			III
LKA1		B2					ORF1'a		ORF2a					II
MTQ1		B2					ORF1'a		ORF2a					II
MUS1	A1	B2	C1		ORF0c	ORF1b	ORF1'd	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
MYS1	A1	B2	C1		ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
PER1	A1	B2	C1		ORF0c	ORF1b	ORF1'd	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
PHL1		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
REU0		B2					ORF1'a		ORF2a					II
SEN1			C1							ORF3a	ORF4a			-
TWN1		B2					ORF1'a		ORF2a					II
USA1		B2					ORF1'a		ORF2a					II
USA2	A1	B2	C1		ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
REU1	A2				ORF0a	ORF1a								I
REU2	A2				D1	ORF0b	ORF1a						ORF5b	I
REU3	A2	B1	C1	D1	ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b	ORF3a	ORF4a	ORF5b		I
REU4	A2		C1		ORF0a	ORF1a				ORF3a	ORF4a			I
REU5			C1							ORF3a	ORF4a			-
REU7	A2				ORF0b	ORF1a								I
REU9	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU11	A2				ORF0a	ORF1a								I
REU12	A2	B1	C1	D1	ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b	ORF3a	ORF4a	ORF5b		I
REU13	A2	B1	C1	D1	ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b	ORF3a	ORF4a	ORF5b		I
REU15	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU17	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU18		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU19		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU20	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU21		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU22	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU24		B1	C1				ORF1'b		ORF2b	ORF3a	ORF4a			I
REU25			C1							ORF3a	ORF4a			-
REU26	A2	B1			ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU28		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU29	A2	B1	C1		ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b	ORF3a	ORF4a			I
REU30	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU31	A2	B1	C1	D1	ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b	ORF3a	ORF4a	ORF5b		I
REU32	A2	B1			ORF0a	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU33	A2	B2			ORF0a	ORF1a	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a					I-II
REU34	A2	B1			D1	ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b				I
REU35		B1			C1			ORF1'b		ORF2b		ORF5b		I
REU37		B1	C1				ORF1'b		ORF2b	ORF3a	ORF4a			I
REU38	A2	B1			ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU39	A2	B1			ORF0b	ORF1a	ORF1'b	ORF1'b	ORF2b					I
REU40	A2	B2	C1	D2	ORF0b	ORF1a	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a	ORF5a		I-II
REU41		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU42	A1	B2	C1	D2	ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a	ORF5a		II
REU43		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU45		B1	C1				ORF1'b		ORF2b	ORF3a	ORF4a			I
REU46		B1					ORF1'b		ORF2b					I
REU47	A2				ORF0b	ORF1a								I
REU48		B1					ORF1'b		ORF2b					I
SCYLV-A	A1	B2	C1	D2	ORF0c	ORF1b	ORF1'a	ORF1'a	ORF2a	ORF3a	ORF4a	ORF5		II
C1		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
C4		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
N6		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
B1		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
L1		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
G2		B2	C1				ORF1'a		ORF2a	ORF3a	ORF4a			II
maia			C1							ORF3a	ORF4a			-

a : ORF 1 partiel déterminé à partir de la séquence nucléotidique du fragment A ; b : ORF 1 partiel déterminé à partir de la séquence nucléotidique du fragment B, c : ORF 1 déterminé à partir des séquences nucléotidiques des fragments A et B

Pour l'ORF 3 (184 acides aminés/192 soit 95,8%), déduit du fragment C, les 32 individus sont distribués en deux groupes (Figure 28) : un groupe ORF3a majoritaire très peu variable (97,2 à 100% d'homologie) et composé de 30 individus d'origines diverses (dont La Réunion), et un groupe ORF3b composé de deux individus originaires de Chine et de Cuba (CHN1 et CUB2). La variabilité inter-groupe est de 93,4 à 95,6%. Pour l'ORF 4 (149 acides aminés/142 soit 98,0%), aussi déduit du fragment C, les groupes phylogénétiques et les pourcentages d'homologie sont similaires à ceux de l'ORF 3 (Figure 29).

L'arbre correspondant à l'ORF 5 partiel (419 acides aminés/480 soit 87,3%), déduit du fragment D, a été construit avec seulement 11 individus (Figure 29). Deux groupes ont été mis en évidence : un groupe ORF5a, formé de cinq individus originaires de La Réunion (REU40 et REU42), du Brésil (BRA1), de Colombie (COL4) et des Etats-Unis (SCYLV-A) et un groupe ORF5b constitué de six isolats de La Réunion. La variabilité au sein du groupe ORF5b (98,0 à 100% d'homologie) est similaire à celle observée au sein du groupe ORF5a (99,2 à 100% d'homologie). Les homologies entre les isolats des deux groupes sont comprises entre 94,5 et 96,1%.

Une seconde analyse portant sur les ORFs 3 et 4, déduits du fragment C, a également été effectuée en ajoutant les séquences de trois *Poliovirus* (CYDV-RPV, PLRV et BYDV-RPV) qui n'étaient pas trop distantes de celles des isolats de SCYLV (Figure 30). Ces autres virus de la famille des *Luteoviridae* ont donc pu être utilisés comme "outgroup" pour la construction d'arbres phylogénétiques. Deux groupes ont été identifiés : un groupe ORF3'a très peu variable (93,4 à 100% d'homologie) et composé de tous les isolats de SCYLV, et un groupe ORF3'b composé des trois autres *Luteoviridae* relativement éloignés entre eux (65,0 à 91,7% d'homologie). La variabilité inter-groupe est très élevée (24,4 à 28,9% d'homologie). L'arbre correspondant à l'ORF 4 déduit du fragment C est similaire à celui construit avec l'ORF 3 et les pourcentages d'homologie sont du même ordre de grandeur (Figure 30).

5.5. Variabilité de l'ensemble du génome

Des séquences nucléotidiques et protéiques ont été obtenues pour 65 isolats de SCYLV. Lorsqu'on prend en considération l'ensemble du génome (i.e. tous les fragments et ORFs analysés), chaque isolat viral peut être caractérisé par un profil génétique en fonction des divers groupes phylogénétiques dans lesquels il a été classé. On distingue ainsi trois grands profils (Tableau 16) :

- un premier profil (profil génétique I) rassemble 34 isolats tous originaires de La Réunion ; ce profil est assez homogène car, si l'on fait abstraction des séquences manquantes, une variation est uniquement observée pour le groupe phylogénétique de l'ORF 0 (ORF0a ou ORF0b),
- un deuxième profil (profil génétique II) est partagé par 22 isolats d'origines géographiques diverses (Brésil, Colombie, Sri-Lanka, Martinique, Maurice, Malaisie, Pérou, Taïwan, Argentine, Guatemala et Etats-Unis) et deux isolats de La Réunion (REU0 et REU42) ; il est aussi assez homogène car une variation est seulement observée pour les isolats MUS1 de Maurice et PER1 du Pérou (appartenance au groupe phylogénétique ORF1'd et non ORF1'a),
- un troisième profil (profil génétique III) n'est commun qu'à trois isolats originaires de Cuba (CUB1 et CUB2) et de Chine (CHN1) qui se distinguent par leur appartenance aux groupes phylogénétiques B3, C2, ORF1'c, ORF2c, ORF3b et ORF4b.

Deux isolats de la Réunion ont un profil intermédiaire entre le profil génétique I et le profil génétique II : REU33 appartient aux groupes A2, ORF0a et ORF1a caractéristiques de la

majorité des isolats de La Réunion mais aussi au groupe B2, ORF1'a, ORF1" a et ORF2a caractéristiques des isolats d'autres zones géographiques ; REU40 appartient aux groupes A2, ORF0b et ORF1a caractéristiques de la majorité des isolats de La Réunion mais aussi aux groupes B2, C1, D2, ORF1'a, ORF1" a, ORF2a et ORF5a caractéristiques des isolats d'autres pays. Quatre isolats sont inclassables car les données disponibles ne sont pas en nombre suffisant ou pas suffisamment discriminant. Il s'agit de SEN1 du Sénégal, REU5 et REU25 de La Réunion et maïs du Brésil.

6. Discussion et conclusion

Aucune information sur la variabilité du génome du SCYLV n'était disponible lorsque notre étude a été commencée. Cependant, il avait été démontré que le SCYLV est issu d'une recombinaison des trois genres constituant la famille des *Luteoviridae* (*Luteovirus*, *Poliovirus* et *Enamovirus*) et de ce fait, il était peu probable que les régions variables soient identiques à celles des autres virus de cette famille (Moonan *et al.*, 2000). En conséquence, nous avons choisi d'analyser l'ensemble du génome en séquençant des fragments représentatifs de chacun des six ORFs constituant le génome du SCYLV.

Les résultats obtenus lors des essais d'amplification du génome viral par RT-PCR avec les cinq couples d'amorces différents ont constitué les premiers indicateurs en faveur d'une variabilité génomique du SCYLV. En effet, les amorces YLS111 et YLS462 sont les seules qui ont permis de détecter le virus dans quasiment tous les échantillons (un seul cas négatif sur 72). Ces amorces apparaissent donc tout à fait appropriées pour le diagnostic du SCYLV par RT-PCR (Chatenet *et al.*, 2001 ; Comstock *et al.*, 1998 ; Rassaby *et al.*, 1999 ; Schenck et Lehrer, 2000). En revanche, le nombre d'amplifications positives était nettement plus faible (25 à 92%) pour les autres couples d'amorces. Au vu du nombre d'échantillons amplifiés pour chaque couple d'amorces, et étant donné que les échantillons étaient bien infectés par le SCYLV, il était possible de faire une première estimation de la variabilité du SCYLV en se basant sur plusieurs parties du génome. Ainsi, en émettant l'hypothèse que la variabilité du SCYLV est liée au nombre d'amplifications positives, la région correspondant au fragment C (ORFs 3 et 4) pouvait être considérée comme étant la plus conservée, suivie des régions correspondantes aux fragments A et B. Le fragment D apparaissait comme le plus variable au vu du nombre d'amplifications très faibles.

Ce classement n'est pas tout à fait validé par les résultats des analyses phylogénétiques basées sur les séquences nucléotidiques de ces fragments. En effet, les pourcentages d'homologie les plus faibles sont similaires entre les isolats de SCYLV pour les quatre fragments (A, B, C et D) et ils varient entre 89,7% et 95,6%. Le fragment le plus variable est le fragment B pour lequel les isolats des groupes B2 et B3 n'ont que 89,7 à 90,9% d'homologie. Le fragment C est effectivement le moins variable avec des pourcentages d'homologie les plus faibles allant de 94,0 à 95,6 entre les groupes C1 et C2. De même, pour les ORFs 3 et 4 issus de ce fragment, nous avons pu aligner des séquences d'autres *Poliovirus* (CYDV-RPV, PLRV et BYDV-RPV), confirmant l'hypothèse que cette région est la plus conservée au sein des *Luteoviridae* (Mayo et Miller, 1999). Il est à noter que la plupart des mutations existant sur les séquences nucléotidiques pour les différents isolats étaient des mutations silencieuses au niveau protéique. Ce phénomène est fréquent dans la nature et pour cette raison, les pourcentages d'homologie les plus faibles variaient pour les groupes ORF1'b et ORF1'c entre 80,8 et 84,9%. En analysant les arbres phylogénétiques on a pu constater que la grande majorité des individus originaires de La Réunion se regroupaient toujours au sein d'un groupe phylogénétique peu variable que l'on appellera "population Réunion". Les autres individus originaires d'autres zones géographiques se

regroupaient dans un groupe nettement plus variable que l'on appellera "population internationale".

Des exceptions existent cependant pour les isolats de La Réunion : l'isolat REU42 a le même profil génétique sur l'ensemble du génome que les isolats de la population internationale (profil génétique II, tableau 16). Les isolats REU33 et REU40 ont des profils dont certaines parties du génome s'apparentent à la population Réunion et d'autres parties à la population internationale. Il est intéressant de noter que REU40 et REU42 sont deux isolats qui ont été prélevés dans la même parcelle à La Réunion et à partir du même cultivar : SP71-6163. Ce clone, principalement cultivé au Brésil, a subi des pertes de rendement supérieures à 30% au début des années 90 (Burnquist et Vega, 1996 ; Lockhart et Cronje, 2000 ; Vega *et al.*, 1997). On peut donc émettre l'hypothèse que le YLS a fait son apparition à La Réunion par l'introduction de ce cultivar avant que la maladie n'ait été caractérisée. La souche virale introduite n'a pas évolué dans le cultivar dans lequel elle se trouvait et, pour cette raison, existerait encore sur l'île ; néanmoins, lors de sa dissémination par l'intermédiaire d'insectes vecteurs, elle a pu évoluer vers un type de virus distinct du virus d'origine : évolution du profil génétique II vers le profil génétique I en passant par des intermédiaires I-II. Etant donné que la variabilité au sein de la population Réunion est beaucoup plus faible que celle de la population internationale, il n'est pas illogique de penser que la population Réunion dérive de la population internationale. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi La Réunion possède des représentants de la population internationale, de la population Réunion et des individus qui se situent entre les deux. Ces derniers seraient alors probablement issus de recombinaisons que l'on sait très répandues au sein de cette famille de virus (Chaloub et Lapierre, 1995).

On peut aussi considérer qu'à la vue de nos résultats, l'origine du SCYLV à La Réunion ne peut être définie et que celle-ci reste inconnue. Etant donné que la canne à sucre n'est pas native de La Réunion et qu'elle y a été introduite il y a environ 315 ans (Girard et Payet, 1997), l'apparition du SCYLV sur l'île en provenance d'une autre zone géographique est néanmoins très probable car aucun hôte secondaire du virus n'a été identifié à ce jour (Schenk et Lehrer, 2000 ; Lehrer *et al.*, 2001a). Le SCYLV serait donc originaire d'un ou plusieurs pays non représentés dans notre étude ou alors il a rapidement évolué depuis son introduction à La Réunion selon le principe de fondation. Un phénomène similaire a été observé avec un autre virus à La Réunion, le *Maize streak virus* ou MSV (Peterschmitt *et al.*, 1996). Il a été démontré que les isolats de MSV de La Réunion se distinguent des isolats originaires du continent africain. Ce phénomène avait été expliqué par le fait que La Réunion n'est pas une île dérivant d'une plaque continentale mais est apparue par suite d'éruptions volcaniques au-dessus d'un point chaud. Le MSV existait probablement depuis longtemps en Afrique où il était propagé par des insectes vecteurs. Ces derniers arrivant à La Réunion ont amené une sous-population de virus dans un nouveau lieu géographique : c'est ce qu'on appelle l'effet fondateur. De plus, le maïs n'étant pas présent à l'époque sur l'île, le virus s'est multiplié dans un premier temps sur d'autres hôtes et, quand le maïs est apparu, il s'est installé sur cette plante en se diversifiant. Par ailleurs, les mutations sont davantage favorisées chez les virus dont la transmission fait intervenir des insectes vecteurs que chez les virus transmis essentiellement lors de la propagation végétative de la plante hôte (Smith et Barker, 1999). Le SCYLV semble essentiellement propagé à La Réunion par l'intermédiaire de boutures contaminées. La transmission via *Melanaphis sacchari* a cependant bien lieu sur l'île dans certaines zones géographiques, comme c'est le cas à Hawaii (Schenk et Lehrer, 2000). Ces insectes vecteurs sont très actifs et des parcelles saines sont rapidement contaminées. La combinaison de la propagation par insectes vecteurs et de la propagation par multiplication végétative pourrait être à l'origine d'une diversité génétique importante du SCYLV, et contribuer à l'établissement de génotypes du virus dans certaines zones géographiques comme à La Réunion.

Très récemment, une étude de la variabilité de l'ORF 2 avec 16 isolats d'Amérique a montré l'existence de deux groupes (Moonan et Mirkov, 2001) : un "super-groupe" majoritaire constitué d'isolats de plusieurs pays et une "population C" minoritaire constituée de trois isolats de Colombie. Etant donné que la variabilité au sein de la "population C" était supérieure à celle de la "super-population", Moonan et Mirkov ont émis l'hypothèse que la "super-population" dériverait de la "population C" et, pour cette raison, la "population C" serait à l'origine du YLS sur le continent américain. Au cours de notre étude, les isolats de Colombie (C1, C4 et COL4) ne sont pas individualisés par rapport aux autres et sont toujours regroupés avec des isolats d'origines géographiques diverses, notamment avec des isolats du continent américain (Brésil, Pérou, Argentine et Etats-Unis). Ces résultats divergents pourraient être liés à la nature du fragment étudié. Moonan et Mirkov (2001) ont analysé la diversité du SCYLV en se basant sur l'ORF 2 entier alors qu'au cours de notre étude, seul l'ORF 2 partiel (56,8%) a été considéré. On notera aussi que l'isolat C3, qui est le plus isolé au sein de la "population C", n'a pas été inclus à nos analyses à cause d'un nombre trop élevé d'incertitudes de séquençage. Le fragment B comporte une partie (partie C terminale) de l'ORF 1 (33,7%) et l'ORF 2 n'y est pas entièrement représenté (seulement 56,8% de la partie N terminale). La divergence des isolats de Colombie serait donc essentiellement due à leur variabilité au niveau de la partie C terminale de l'ORF 2. On précisera aussi que les méthodes d'analyses phylogénétiques étaient différentes entre les deux études : Moonan et Mirkov (2001) ont utilisé une méthode de parcimonie tandis que nous avons appliqué une méthode basée sur les distances génétiques. Notre étude a permis de mettre en évidence une variabilité génomique plus importante au sein du SCYLV que celle de Moonan et Mirkov (2001). Cette différence pourrait être liée à un nombre d'isolats plus important et plus diversifié : 16 isolats issus du continent américain (16 cultivars originaires de 5 pays) contre 65 isolats issus du monde entier [40 isolats représentatifs de La Réunion (15 cultivars originaires de 5 localités) et 25 isolats représentatifs d'autres zones géographiques (25 cultivars originaires de 15 pays)] et à une couverture plus large du génome : ORF 2 entier contre six ORFs entiers ou partiels.

La nature et l'expression des symptômes du syndrome de la feuille jaune apparaissent variables en fonction des zones de culture dans le monde. Dans la majorité des zones géographiques, le YLS se traduit par un jaunissement progressif de la face abaxiale des nervures foliaires suivi d'un jaunissement et d'une nécrose progressifs du limbe (Comstock *et al.*, 1998 ; Lockhart et Cronjé, 2000 ; Schenck *et al.*, 1997). En revanche, d'autres symptômes de jaunissement du feuillage ont été associés à la maladie au Pérou (Alegria *et al.*, 2000). Par ailleurs, le virus peut être présent dans plusieurs zones de culture ou dans différents cultivars de canne à sucre sans qu'il y aie expression de symptômes. Au Brésil, le cultivar SP71-6163 a montré des symptômes sévères de maladie qui se sont traduits par des diminutions importantes de rendement (Burnquist et Vega, 1996 ; Vega *et al.*, 1997). En Louisiane, par contre, des diminutions de rendement ont pu être attribuées au SCYLV sans que les cultivars infectés n'aient présenté de symptômes (Grisham *et al.*, 2000). Sous réserve de confirmation par d'autres études, il apparaît que le SCYLV est essentiellement transmis à La Réunion par des boutures infectées et que la transmission par insectes vecteurs y est moins rapide que dans d'autres zones géographiques, comme à Hawaii par exemple (Schenck et Lehrer, 2000). Ces caractéristiques biologiques variables de la maladie peuvent être attribuées à des variations environnementales ou à d'autres facteurs biotiques (phytoplasmes par exemple) ou abiotiques, mais aussi à une variation de l'agent pathogène. Au cours de notre étude, nous avons démontré qu'il existe une variabilité importante du génome du SCYLV et que plusieurs ORFs étaient impliqués dans ce phénomène. Des travaux plus spécifiques devraient être entrepris tels que l'inoculation de cultivars sensibles et résistants avec des isolats du virus appartenant à des groupes génétiques différents, ou des transmissions de différentes souches virales à divers hôtes, afin de préciser les relations existant entre la variabilité des caractéristiques biologiques du YLS et la variabilité génomique du SCYLV.

VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En comparant les caractéristiques agronomiques de cannes à sucre infectées par le SCYLV et celles de cannes à sucre indemnes de ce virus, un impact significatif du SCYLV sur la production en tonnage (23%) et en sucre (11%) a été mis en évidence dès le premier cycle de récolte sur un des trois cultivars étudiés, le cultivar R577. Il s'agit là d'une démonstration de l'incidence économique que peut avoir le syndrome de la feuille jaune et ce résultat remet en cause une opinion largement répandue à La Réunion, voire ailleurs dans le monde, selon laquelle le SCYLV n'aurait pas d'impact sur la culture de la canne à sucre. De plus, malgré une proportion non négligeable de jaunissements foliaires causés par divers facteurs, un pourcentage important de jaunissements (10 à 60% selon le cultivar) a pu être attribué au SCYLV. Les symptômes les plus sévères sont clairement liés à la présence de cet agent pathogène. Ces résultats indiquent également que le syndrome de la feuille jaune causé par le SCYLV doit être pris en compte dans le cadre général de la lutte contre les maladies de la canne à sucre. Etant donné que les taux d'infection du virus ont peu évolué sur une période de 30 mois, quel que soit le lieu et le cultivar étudiés, une sélection sanitaire pourrait être envisagée. Des travaux plus spécifiques doivent encore être menés afin d'élaborer une stratégie de lutte propre à La Réunion. Par exemple, des expérimentations sur la dissémination du SCYLV par les pucerons en milieu naturel devraient être mises en place avec les cultivars plantés à La Réunion. Les études sur la contamination de matériel végétal sain réalisés à La Mare avec le cultivar R575 ont permis d'obtenir des données préliminaires sur le stade d'infection optimum par les pucerons. Celui-ci serait situé dans une période comprise entre la plantation et deux mois de croissance de la canne à sucre au champ. Cependant, ces conclusions pourraient être totalement différentes pour un autre cultivar ou pour une autre zone de culture car les populations de pucerons peuvent varier d'un lieu à l'autre en fonction du climat et de l'altitude. Ces travaux complémentaires devraient aussi permettre de préciser s'il existe des lieux et/ou des cultivars avec de faibles taux de contamination. Au cas où cette situation aurait lieu, des pépinières plantées avec du matériel végétal assaini pourraient être mises en place pour limiter les épidémies et réduire ainsi l'incidence de la maladie.

Mise à part la lutte prophylactique à l'aide de matériel végétal sain, l'utilisation de la résistance variétale pourrait également être envisagée à La Réunion. Etant donné que les taux d'infection du SCYLV sont relativement stables au cours du temps, mais qu'ils varient selon les cultivars, on peut émettre l'hypothèse que ces variations sont liés à des mécanismes de résistance de la canne à sucre au YLS. Ces mécanismes peuvent être situés à différents niveaux, depuis la transmission par les insectes jusqu'à l'expression des symptômes de maladie après colonisation de la plante, mais sont encore à identifier. Des cultivars immuns qui ne sont pas colonisés par le SCYLV, même après contamination artificielle par les pucerons vecteurs, ont récemment été identifiés à Hawaii (Lehrer *et al.*, 2001a). Il existe également des cultivars qui ont été qualifiés de résistants au YLS car aucun agent causal de cette maladie n'y a jamais été détecté, même lorsqu'ils étaient cultivés à proximité d'autres cultivars présentant de forts taux d'infection. C'est le cas de M1176/77 à Maurice (Moutia et Saumtally, 1999) ou CP57-603 et CP89-1509 en Floride (Comstock *et al.*, 1998).

Au cas où la résistance variétale s'avère nécessaire pour lutter contre le YLS, comme à Hawaii par exemple où la plantation de matériel végétal sain est inopérante, des méthodes et des critères de criblage variétal doivent être mis au point. Dans ce cas, parmi les facteurs clés à prendre en compte, on peut citer les sources d'inoculum et la présence d'insectes vecteurs, ainsi que la diversité et la variabilité des souches virales présentes. Une bonne connaissance de ces facteurs est indispensable pour un criblage efficace et l'identification de cultivars résistants. La variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV est à ce jour inconnue. En revanche, nous avons démontré au cours de notre étude que le génome du SCYLV est très variable. Selon la partie du

génome considérée, il existe deux à quatre groupes de virus. Un de ces groupes est peu variable et rassemble la grande majorité des isolats de SCYLV de La Réunion et uniquement des isolats de cette île. Un autre groupe est plus variable et comprend des isolats d'autres pays situés sur plusieurs continents (Amérique, Asie et Afrique), ainsi qu'un faible nombre d'isolats originaires de La Réunion. Les deux autres groupes, quand ils sont mis en évidence, ne sont constitués que d'un faible nombre d'isolats : deux isolats originaires de Cuba et/ou de Chine pour un groupe et deux isolats originaires du Pérou et de Maurice pour l'autre groupe. Au vu de ces résultats, on peut émettre l'hypothèse que le groupe d'isolats majoritaires de La Réunion provient d'une seule introduction qui a pris souche sur l'île. Le groupe d'isolats minoritaires pourrait correspondre soit à la souche virale introduite qui ne serait restée stable que dans son hôte initial, soit à d'autres introductions qui n'ont pris souche à ce jour que très localement à La Réunion.

La présence de plusieurs génotypes de SCYLV à La Réunion est très probablement liée aux introductions de matériel végétal infecté lorsque l'étiologie du YLS était encore méconnue, et que des méthodes de diagnostic ou de détection n'étaient pas encore disponibles en quarantaine. En effet, ce n'est que depuis 1997 que le matériel importé à La Réunion via la quarantaine du CIRAD à Montpellier fait l'objet d'un dépistage systématique du SCYLV (Chatenet *et al.*, 2001). Ces mesures phytosanitaires vont permettre de réduire fortement les risques d'introduction de nouveaux isolats de ce virus à La Réunion. De nouvelles études de variabilité et de diversité du SCYLV pourraient être menées dans quelques années pour analyser l'évolution de la structure génétique du virus sur l'île et la dynamique de ses populations.

Aucune donnée n'est disponible à ce jour sur la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV. L'existence d'une variabilité génétique importante est cependant en faveur de la présence de souches virales à pathogénie variable qui restent à identifier. Le fragment A contenant l'ORF 0 (probablement lié à l'expression des symptômes) est une région du génome très variable qui pourrait être à l'origine des divers jaunissements observés de part le monde. Le fragment B contenant les ORFs 1 et 2 (impliqués dans la réplication virale) est le fragment qui semble apporter le plus d'informations sur la variabilité du génome. Le fragment C qui comprend les ORFs 3 (protéine de capsid) et 4 (protéine de mouvement) est très conservé, même à l'intérieur des virus de la famille des *Luteoviridae*. Le fragment D est aussi sujet à des variations plus ou moins importantes, mais il n'a pu être amplifié qu'à partir de peu d'isolats. Il comprend l'ORF 5 impliqué dans la vécion par les pucerons et, étant donné que la relation puceron-vecteur est essentielle dans la pathogenèse et le développement d'épidémies, celui-ci devra faire l'objet de recherches complémentaires pour préciser sa diversité au niveau du génome. Au vu de ces observations il est difficile de retenir un ORF plus qu'un autre pour le choix des isolats dont la pathogénie devrait être caractérisée. Dans ce but, il est préférable de retenir dans un premier temps des isolats représentatifs de la variabilité globale du génome du SCYLV et, une fois les pathotypes viraux identifiés, analyser leurs différences au niveau génétique.

Nos travaux sur la dynamique du SCYLV dans la plante ont permis de montrer que le virus avait une répartition systémique et uniforme depuis la germination des boutures infectées jusqu'à la formation de tiges usinables des quatre cultivars étudiés. Ces résultats indiquent que les cultivars R570, R575, R577 et R579 ne possèdent pas de gènes de résistance à la propagation du virus dans la plante. Si des différences de résistance variétale existent parmi ces cultivars réunionnais, elles pourraient se situer au niveau de la pénétration du virus dans la plante et probablement au niveau des relations cultivars-insectes vecteurs. Cependant, la recherche du virus effectuée dans les quatre cultivars de La Réunion était seulement qualitative et, même si tous les faisceaux du phloème étaient colonisés dans les tiges contaminées par le virus, on ne peut exclure des différences de charges virales entre les quatre cultivars. Il serait donc intéressant et approprié d'étudier la répartition des charges virales du SCYLV dans la plante hôte à l'aide de

PCR quantitatives ou de tests ELISA classiques par exemple. La progression quantitative des populations virales pourrait être menée sur plusieurs cultivars réagissant de manière différente à l'infection par le SCYLV. Elle permettrait de caractériser le type de résistance au SCYLV impliqué dans les différents comportements des cultivars à l'égard du virus : résistance au mouvement ou à l'accumulation des particules virales.

Au début de cette thèse, très peu d'informations étaient disponibles sur le syndrome de la feuille jaune et nous avions choisi d'orienter nos recherches sur plusieurs aspects clés de la maladie. L'objectif était d'apporter des éléments de réponse à diverses problématiques telles que l'incidence de la maladie sur le rendement, l'évolution des taux d'infection au champ et dans la plante et la variabilité de l'agent pathogène. D'autres aspects sont restés en suspens et devront faire l'objet de travaux dans un futur proche. La vection du SCYLV est un élément déterminant de la pathogenèse qui peut avoir des répercussions dans plusieurs domaines comme la lutte contre le YLS. Ce n'est que très récemment que des études exhaustives ont été réalisées à Hawaii sur la nature des insectes vecteurs et leur capacité à transmettre le virus d'une tige de canne à sucre à l'autre (Schenck et Lehrer, 2000). Nos travaux préliminaires sur la vection du SCYLV à La Réunion ont aussi permis d'identifier deux espèces de pucerons présents sur canne à sucre et qui sont des vecteurs potentiels du SCYLV : *Melanaphis sacchari* et *Rhopalosiphum maidis*. La présence du virus dans l'espèce *Melanaphis sacchari* a été vérifiée mais sa capacité vectrice à La Réunion demande à être précisée. Contrairement à ce qui se passe à Hawaii (Schenck et Lehrer, 2000) ou en Floride (Comstock *et al.*, 1998), la transmission par puceron ne semble pas être aussi importante à La Réunion que la transmission par boutures infectées. Sur cette île, les transmissions primaires de la maladie par les pucerons, de cannes à sucre malades à des cannes à sucre saines, pourraient n'avoir lieu que pendant une fenêtre étroite de contamination située dans les deux premiers mois de croissance de la plante. Sous réserve de vérification de ce phénomène dans diverses zones de culture de la canne à sucre, ces observations pourraient avoir des implications essentielles dans la lutte contre la maladie. En Afrique du Sud, l'incidence de la mosaïque a pu être fortement réduite en décalant les périodes de plantation afin que la période de réceptivité de la canne à sucre ne coïncide pas avec la période de fortes pullulations des populations de pucerons vecteurs du *Sugarcane mosaic virus* (Bailey et Fox, 1980). Une pratique similaire pourrait être envisagée dans le cadre de la lutte contre le SCYLV à La Réunion. Des données sur la dynamique des insectes vecteurs du SCYLV devront cependant être préalablement obtenues.

Depuis la découverte d'un virus associé au YLS (1995-1996), des progrès importants ont été faits dans la connaissance du pathosystème YLS/SCYLV : caractérisation de la symptomatologie, mise au point d'outils de diagnostic et de détection, identification des insectes vecteurs, production de matériel végétal assaini, décryptage du génome du virus et caractérisation de sa variabilité... Cependant, de nombreux points d'interrogation subsistent encore qui, vu l'importance de la maladie dans le monde sucrier et l'intérêt scientifique qu'elle suscite, feront certainement l'objet de nombreuses recherches au cours des prochaines années.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALEGRIA O.M., CHATENET M., GIRARD J-C.,** 2000. First report of *Sugarcane yellow leaf virus* in Peru. *Plant Disease*, 84 (12): 1342.
- ALEXANDER A.G. (Eds),** 1973. Sugar cane physiology. Elsevier Scientific Publishing Compagny, New-York, USA, 752 p.
- ALJANABI S.M., PARMESSUR Y., JONES P., SAUMTALLY S., DOOKUN A.,** 2001. Detection and characterisation of Sugarcane yellows phytoplasma. *In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress*. 16-21 September 2001, Brisbane, Australia, 24: 343-348.
- ANONYME,** 1983. La fabrication du sucre à partir de la canne à sucre. Industrielle Sucrière de Bourbon. Document dactylographié, 8 p.
- ANONYME,** 1989. Mémento agricole - Chiffres 1998. Direction de l'Agriculture et de la Forêt de La Réunion. Document dactylographié, 6 p.
- ANONYME,** 2000. L'île en quelques chiffres. *Le Journal de l'île de La Réunion*, supplément du 28 octobre 2000, pp 8-9.
- ANONYME,** 2001. La phylogénie. Centre de Ressources INFOBIOGEN, <URL : <http://www.infobiogen.fr/doc/tutoriel/PHYLO/phylogenie.html>>.
- BAILEY R.A., FOX P.H.,** 1980. The susceptibility of varieties to mosaic and the effect of planting date on mosaic incidence in South Africa. *In Proceedings of South Africa Sugar Technologist Association Congress*, 64: 1-7.
- BARKER H.,** 1987. Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by Potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with Potato Y potyvirus. *Journal of General Virology*, 68: 1223-1227.
- BARKER H.,** 1989. Specificity of the effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteovirus in co-infected plants. *Annals of Applied Biology*, 115: 71-78.
- BARKER H., WATERHOUSE P.M.,** 1999. The development of resistance to Luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. *In SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 169-210.
- BERTILE W.,** 1987. La Réunion : atlas thématique et régional. Arts Graphiques Modernes, Saint-Denis, France, 162 p.
- BLACKBURN F. (Eds),** 1984. Sugar cane. Editions Longman Group UK Limited, New-York, USA, 364 p.
- BORTH W., HU J.S., SCHENCK S.,** 1994. Double-stranded RNA associated with sugarcane yellow leaf syndrome. *Sugar Cane*, 3: 5-8.

BOUCHERY Y., 1977. Le puceron noir de la fève *Aphis fabae* Scop. (Homoptère *Aphididae*) en Alsace : fluctuations des populations sur féverole de printemps en relation avec les facteurs du milieu (température, pluviométrie, aphidiphages, plante-hôte). Annales de Zoologie et Ecologie Animale, 9 (1) : 63-86.

BOURDIN D., LECOQ H., 1994. Increase in Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. Journal of Phytopathology, 141: 143-152.

BRANDES E.W., SARTOIS G.B., GRASSL C.O., 1939. Assembling and evaluating wild forms of sugarcane and closely related plants. In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists, 6: 128-154.

BRAULT V., HERRBACH E., HAUSER S., LEMAIRE O., 2001. Les *Luteoviridae* : propriétés biologiques et évolution. Virologie, 5 (1) : 9-21.

BURNQUIST W.L., VEGA J., 1996. Sugarcane diseases in southern Brasil: a brief report. In CROFT B.J., PIGGIN C.M., WALLIS E.S., HOGARTH D.M. (Eds), 1996. Sugarcane germplasm conservation and exchange. In Proceedings of Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia, 67: 59-61.

CAMPBELL E.G., 1925. Potato leafroll as affecting the carbohydrate, water, and nitrogen content of the host. Phytopathology, 15: 427-430.

CARAUX G., GASCUEL O., ANDRIEU G., LEVY D., 1995. Approches informatiques de la reconstruction d'arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires. Techniques et Sciences Informatiques, 14 (2) : 113-139.

CHATENET M., DELAGE C., RIPOLLES M., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., ROTT P., 2001. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. Plant Disease, 85 (11): 1177-1180.

CHALHOUB B.A., LAPIERRE H.D., 1995. Importance des recombinaisons ARN dans l'évolution des *Luteovirus*. Agronomie, 15 : 393-400.

COMSTOCK J.C., IRVINE J.E., MILLER J.D., 1994. Yellow leaf syndrome appears on the United States Mainland. Sugar Journal, 94: 33-35.

COMSTOCK J.C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., WANG Z.K., 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. Sugar Cane, 4: 21-24.

COMSTOCK J.C., MILLER J.D., TAI P.Y.P., FOLLIS J.E., 1999. *Sugarcane yellow leaf virus* in Florida: incidence and resistance. In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 22-26 February 1999, New-Delhi, India, 23: 366-372.

CRONJE C.P.R., TYMON A.M., JONES P., BAILEY R.A., 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. Annals of Applied Biology, 133: 177-186.

CRONJE C.P.R., BAILEY R.A., 1999. Association of phytoplasmas with yellow leaf syndrome of sugarcane. *In* Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 22-26 February 1999, New-Delhi, India, 23: 373-381.

CRONJE C.P.R., JONES P., 2000. A phylogeny of the phytoplasmas based on the 16-23S rDNA region of the genome. *In* Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Cha-am, Thailand, 6: P-1.

CRUZ S.S., ROBERTS A.G., PRIOR D.A.M., CHAPMAN S., OPARKA K.J., 1998. Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: the role of virions. *The Plant Cell*, 10: 495-510.

DANIELS J., ROACH B.T., 1987. Taxonomy and evolution. *In* HEINZ D.J. (Eds), 1987. Sugarcane improvement through breeding. Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp 7-84.

DAUGROIS J.H., BOISNE-NOC R., ROTT P., 2000. Testing sugarcane for resistance to *Sugarcane yellow leaf virus*. *In* Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Cha-am, Thailand, 6: Ph-8.

DAVIS M.J., DEAN J.L., HARRISON N.A., 1988. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. *Phytopathology*, 78: 462-468.

DAVIS M.J., 2000. Detection of phytoplasmas in sugarcane in Florida. *In* Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Cha-am, Thailand, 6: Ph-12.

DELAGE C., 1998. Efficacité de la culture in vitro pour assainir la canne à sucre atteinte du virus de la feuille jaune. Mémoire I.U.T. de Dijon/CIRAD-Ca de Montpellier, 20 p.

DERRICK P.M., BARKER H., 1992. The restricted distribution of Potato leafroll luteovirus antigen in potato plants with transgenic resistance resembles that in clones with one type of host gene-mediated resistance. *Annals of Applied Biology*, 120: 451-457.

DING B., HAUDENSHIELD J.S., HULL R.J., WOLF S., BEACHY R.N., 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell*, 4: 915-928.

DRAKE J.W., 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *In* Proceedings of National Academy of Sciences, 90: 169-210.

ESAU K., 1957. Phloem degeneration in *Gramineae* affected by the Barley yellow dwarf virus. *American Journal of Botany*, 44: 245-251.

FALK B.W., DUFFUS J.E., MORRIS T.J., 1979. Transmission, host range, and serological properties of the viruses that cause lettuce speckles disease. *Phytopathology*, 69: 612-617.

F.A.O., 2001. FAOSTAT Database Gateway. <URL: <http://apps.fao.org/lim500>>.

FAUCONNIER R., BASSEREAU D. (Eds), 1970. *La canne à sucre. Techniques agricoles et productions tropicales*. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 468 p.

FELSENSTEIN J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17: 368-376.

FLOR H.H., 1955. Host-parasite interaction in *flax* rust. Its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45: 680-685.

GAUTHERET D., 2001. Bioinformatique fonctionnelle : les données de la génomique <URL : <http://www.esil.univmrs.fr/~dgaut/Cours/protouadn.htm>>.

GILDOW F.E., 1999. Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. *The Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 88-112.

GIRARD J.C., PAYET J., 1997. La maîtrise des maladies de la canne à sucre à La Réunion : un effort continu de lutte depuis plus de soixante ans. *In* 4^e congrès international de l'Association réunionnaise pour le développement de la technologie agricole et sucrière (Artas) et 2^{es} rencontres en langue française de l'Association française de la canne à sucre (Afcas). 12-18 Octobre 1997, Saint-Denis, La Réunion, pp 249-259.

GRISHAM M.P., PAN Y.-B., LEGENDRE B.L., GODSHALL M.A., EGGLESTON G., 2000. Effect of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality. *In* Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Chiang Mai, Thailand, 6: Ph-16.

GUILLEY H., WIPF-SCHEIBEL C., RICHARDS K., LECOQ H., JONARD G., 1994. Nucleotide sequence of Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology*, 202: 1012-1017.

HARRISON B.D., 1999. Steps in development of Luteovirology. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. *The Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 1-14.

HOARAU M., 1969. Sugar cane analysis by hydraulic press method. *International Sugar Journal*, 71: 328-332.

IOANNIDOU D., LETT J.M., PINEL A., ASSIGBETSE K., BRUGIDOU C., GHESQUIERE A., NICOLE M., FARGETTE D., 2000. Responses of *Oryza sativa japonica* spp. to infection with *Rice yellow mottle virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57: 177-188.

IRVINE J.E., 1978. Identification of cold tolerance in *Saccharum* and related genera through refrigerated freeze screening. *In* Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists, 61: 147-156.

JENSEN S.G., 1969. Photosynthesis, respiration, and other physiological relationships in Barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 58: 204-208.

JOLLY C.A., MAYO M.A., 1994. Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of Potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology*, 201: 182-185.

- JUKES T.H., CANTOR C.R.,** 1969. Evolution of protein molecules. *In* MUNRO H.N. (Eds), Mammalian protein metabolism, Academic Press, New-York, USA, pp 21-132.
- KILLICK R.,** 1979. The effect of infection with potato leafroll virus (PLRV) on yield and some of its components in a variety of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, 9: 67-74.
- KLINGAUF F.A.,** 1987. Host plant finding and acceptance. *In* MINKS A.K., HARREWIJN P. (Eds), 1987. World Crop Pest Aphids - Volume 2a. Elsevier Scientific Publishing Compagny, New-York, USA, pp 209-223.
- KIMURA M.,** 1980. A simple method for estimated evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- KOONIN E.V., DOLJA V.V.,** 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Review of Biochemistry*, 28: 375-430.
- LAZAROWITZ S.G., BEACHY R.N.,** 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell*, 11: 535-548.
- LECOQ H., BOURDIN D., WIPF-SCHEIBEL C., BON M., LOT H., LEMAIRE O., HERRBACH E.,** 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, Cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41: 749-761.
- LECOQ H.,** 1999. Epidemiology of *Cucurbit Aphid-borne Yellows Virus*. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 243-248.
- LEE I.M., GUNDERSEN-RINDAL D.E., DAVIS R.E., BARTOSZYK I.M.,** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- LEHRER A.T., MEINZER R., MOORE P.H., KOMOR E.,** 2000. Movement of ScYLV and impact of its infection on performance and physiology of the sugarcane plant. *In* Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Chiang Mai, Thailand, 6: Ph-6.
- LEHRER A.T., SCHENCK S., FITCH M.M.M., MOORE P.H., KOMOR E.,** 2001a. Distribution and transmission of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in Hawaii and its elimination from seedcane. *In* Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 16-21 September 2001, Brisbane, Australia, 24: 439-443.
- LEHRER A.T., MEINZER R., MOORE P.H., KOMOR E.,** 2001b. Physiological consequences of *Sugarcane yellow leaf virus* infection on the sugarcane plant. *In* Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 16-21 September 2001, Brisbane, Australia, 24: 657-659.
- LETT J.-M., REYNAUD B., PETERSCHMITT M.,** 2001. Les mécanismes de la transmission circulante des virus de plantes par insectes piqueurs-suceurs. *Virologie*, 5 (3) : 169-181.

LIEFTING L.W., ANDERSEN M.T., BEEVER R.E., GARDNER R.C., FORSTER R.L.S., 1996. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of *Phormium* yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environment Microbiology*, 62 (9): 3133-3139.

LOCKHART B.E.L., IREY M.S., COMSTOCK J.C., 1996. Sugarcane bacilliform virus, sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. *In* CROFT B.J., PIGGIN C.M., WALLIS E.S., HOGARTH D.M. (Eds), 1996. Sugarcane germplasm conservation and exchange. *In* Proceedings of Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia, 67: 108-112.

LOCKHART B.E.L., CRONJE C.P.R., 2000. Yellow leaf syndrome. *In* ROTT P., BAILEY R.A., COMSTOCK J.C., CROFT B.J., SAUMTALLY A.S. (Eds), 2000. A guide to sugarcane diseases. CIRAD/ISSCT, Montpellier, France, pp 291-295.

LOUGHNANE J.B., 1941. The susceptibility to leaf roll of certain potato varieties and its effect on their yield. *Journal of the Eire Departement of Agriculture*, 38: 48-67.

MAIA I.G., GONÇALVES M.C., ARRUDA P., VEGA J., 2000. Molecular evidence that (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. *Archives of Virology*, 145: 1009-1019.

MATSUOKA S., MENEGHIN S.P., 1999. Yellow leaf syndrome and alleged pathogens: causal, not causal relationship. *In* Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 22-26 February 1999, New-Delhi, India, 23: 382-389.

MAYO M.A., ZIEGLER-GRAFF V., 1996. Molecular biology of Luteoviruses. *Advances in Virus Research*, 46: 413-460.

MAYO M.A., MILLER W.A., 1999. The structure and expression of *Luteovirus* genomes. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 23-42.

McGRATH P.F., VINCENT J.R., LEI C.H., PAWLOWSKI W.P., TORBERT K.A., GU W., KAEPLER H.F., WAN Y., LEMAUX P.G., RINES H.R., SOMERS D.A., LARKINS B.A., LISTER R.M., 1997. Coat protein-mediated resistance to isolate of Barley yellow dwarf in oats and barley. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 695-710.

MILLER R.G., 1981. *Simultaneous statistical inference*, Springer-Verlag, New-York, USA, 299 p.

MILLER W.A., KOEV G., MOHAN B.R., 1997. Are there risks associated with transgenic resistance to Luteoviruses? *Plant Disease*, 81 (7): 700-710.

MIRANDA G.J., HOGANEZAWA H., 1995. Identification, purification, and serological detection of the major noncapsid protein of rice grassy stunt virus. *Phytopathology*, 85: 1530-1533

MOONAN F., MOLINA J., MIRKOV T.E., 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology*, 269: 156-171.

MOONAN F., MIRKOV T.E., 2001. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American haplotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. Evidence for Colombian origins and intraspecific spatial phylogenetic variation. *Journal of Virology* (sous-presse).

MOUTIA J.-F.Y., SAUMTALLY S., 1999. Symptomology of yellow leaf syndrome and detection and distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Mauritius. *In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 22-26 February 1999, New-Delhi, India, 23: 355-365.*

MOUTIA J.-F.Y., SAUMTALLY S., 2001. Diagnosis of *Sugarcane yellow leaf virus* in cane juice and the effect of hot water treatment on its control. *In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress. 16-21 September 2001, Brisbane, Australia, 24: 444-450.*

NAMBA S., KATO S., IWANAMI S., OYAIKU H., SHIOZAWA H., TSUCHIZAKI T., 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology, 83: 786-791.*

NEI M., 1991. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. *In MIYAMOTO M.M., CRACRAFT J. (Eds), Phylogenetic analysis of DNA sequences. Oxford University Press, United-Kingdom, pp 90-128.*

NJERU R., JONES R.A.C., SIVASITHAMPARAM K., JONES M.G.K., 1995. Resistance to subterranean clover mottle virus in subterranean clover results from restricted cell-to-cell movement. *Australian Journal of Agricultural Research, 46: 633-643.*

OORTWIJN BOTJES J.G., 1920. De bladrolziekte van de aardappleplant. Thesis, Landbouwhoogeschool, Wageningen. *In SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The Luteoviridae. CABI Publishing, United Kingdom, 297 p.*

PARMESSUR Y., DOOKUN A., 2000. Response of *Yellow leaf virus* and *Sugarcane bacilliform virus* to eradication by tissue culture. *In Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Cha-am, Thailand, 6: Ph-15.*

PERALTA E.L., AROCHA Y., RODRIGUEZ M., MARTINEZ B., MUNIZ Y., GONZALEZ L., SANCHEZ I.S., SANCHEZ L., CHINEA A., CARVAJAL O., 2000. Advances in the Cuban research of Sugarcane yellow leaf syndrome. *In Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop. 16-23 July 2000, Cha-am, Thailand, 6: Ph-16.*

PERRIER X., FLORI A., 1999. Les méthodes d'analyse des données. *In HAMON P., SEGUIN M., PERRIER X., GLASZMANN J.C. (Eds), 1999. Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. CIRAD, Montpellier, France, pp 43-76.*

PETERSCHMITT M., 1988. Identification sérologique et dynamique du *Maize streak virus* (MSV) dans le maïs et dans le vecteur *Cicadulina mbila*. Mémoire de thèse de l'Université Paris-Sud, 179 p.

PETERSCHMITT M., GRANIER M., FRUTOS R., REYNAUD B., 1996. Infectivity and complete nucleotides sequence of the genome of a genetically distinct strain of *Maize streak virus* from Reunion Island. *Archives of Virology, 141: 1637-1650.*

PRIOR P.H., BERAMIS M., CHILLET M., SCHMIT J., 1990. Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Sm.) resistance mechanisms. *Symbiosis*, 9: 393-400.

QUANTER H.M., VAN DER LEH H.A., BOTJES J.G., 1916. Nature, mode of dissemination and control of phloem-necroses (leaf roll) and related diseases. *Meded Landbhoogesch*, 10: 91-138. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, 297 p.

QUID on line, 2001. <URL: <http://quidfrance.com/WEB/ETATS/BR/Q027040.HTM#N24>>.

RASSABY L., GIRARD J.-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., ROTT P., 1999. Survey of sugarcane yellow leaf syndrome in Réunion Island. *Sugar Cane*, 10: 16-18.

REMAUDIERE G., ETIENNE J., 1988. Les *Aphididae* (Hom.) des îles et archipels de l'océan Indien. *L'Agronomie Tropicale*, 43 (4) : 327-346.

RICAUD C., 1968. Yellow wilt of sugarcane in eastern Africa. *Sugarcane Pathologist's Newsletter*, 1: 45-49.

RICAUD C., EGAN B.T., GILLASPIE A.G., HUGUES C.G. (Eds), 1989. Diseases of sugarcane- Major diseases. Elsevier Scientific Publishing Compagny, New-York, USA, 399 p.

RIPOLLES M., 1997. Assainissement de la canne à sucre atteinte du syndrome de la feuille jaune par culture de tissus. *Mémoire de l'I.U.T. de Dijon/CIRAD-Ca de Montpellier*, 22 p.

ROBERT Y., LEMAIRE O., 1999. Epidemiology and control strategies. *In* SMITH H.G., BARKER H. (Eds), 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 211-228.

ROCHOW W.F., 1977. Dependent virus transmission from mixed infections. *In* HARRIS K.F., MARAMOROSCH K. (Eds), 1977. *Aphids as virus vectors*. Academic Press, New-York, USA, pp 253-273.

ROTT P., CHATENET M., BAUDIN P., 1988. L'échaudure des feuilles de canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. I. Synthèse bibliographique. *L'Agronomie Tropicale*, 43 (3) : 236-243.

ROTT P., MOHAMED I.S., KLETT P., SOUPA D., DE SAINT-ALBIN A., FELDMANN P., LETOURMY P., 1997. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology*, 87: 1202-1213.

ROTT P., BAILEY R.A., COMSTOCK J.C., CROFT B.J., SAUMTALLY A.S. (Eds), 2000. A guide to sugarcane diseases. CIRAD/ISSCT, Montpellier, France, 339 p.

SAITOU N., NEI M., 1988. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.

SALOMON-BLACKBURN R.M., BARKER H., 1993. Resistance to Potato leafroll luteovirus can be greatly improved by combining two independent types of heritable resistance. *Annals of Applied Biology*, 122: 329-336.

- SCAGLIUSI S.M., LOCKHART B.E.L.,** 2000. Transmission, characterisation, and serology of a *Luteovirus* associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathology*, 90: 120-124.
- SCHAAD M.C., LELLIS A.D., CARRINGTON J.C.,** 1997. VPg of tobacco potyvirus is a host genotype-specific determinant for a long-distance movement. *Journal of Virology*, 10: 8624-8631.
- SCHENCK S.,** 1990. Yellow leaf syndrome – a new sugarcane disease. Experiment Station Hawaiian Sugar Planters' Association Annual Report 1990, p 38.
- SCHENCK S., HU J.S., LOCKHART B.E.L.,** 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of Sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. *Sugar Cane*, 4: 5-8.
- SCHENCK S., LEHRER A.T.,** 2000. Factor affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Disease*, 84 (10): 1085-1088.
- SCHENCK S.,** 2001. Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts. In RAO G.P., FORD R.E., TÖSIC M., TEAKLE D.S. (Eds), 2001. Sugarcane pathology – Volume II: virus and phytoplasma diseases. Science Publishers Inc., Plymouth, United Kingdom, pp 25-35.
- SEMAL J. (Eds),** 1989. *Traité de pathologie végétale*. Presse agronomiques de Gembloux, Bruxelles, Belgique, 621 p.
- SHEFFIELD F.M.L.,** 1943. Value of phloem necrosis in the diagnosis of potato leaf-roll. *Annals of Applied Biology*, 30: 131-136.
- SMITH G.R., BORG Z., LOCKHART B.E.L., BRAITHWAITE K.S., GIBBS M.,** 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 81: 1865-1869.
- SMITH H.G., HALLSWORTH P.B.,** 1990. The effect of yellowing viruses on yield of sugar beet in field trials, 1985 and 1987. *Annals of Applied Biology*, 116: 503-511.
- SMITH H.G., BARKER H. (Eds),** 1999. *The Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, 297 p.
- STUSSI-GARAND C., MUTTERER J., DELECOLLE B., ROHFRISCH B., VANTARD M.,** 1998. Routes intra et intercellulaires utilisées par les virus de plantes pour leur mouvement de cellule à cellule. *Virologie*, 2 (4) : 269-283.
- VAN DEN HEUVEL J.F.J.M., VERBBEK M., PETERS D.,** 1993. The relationship between aphid-transmissibility of Potato leafroll virus and surface epitopes of the viral capsid. *Phytopathology*, 83: 1125-1129.
- VAN DER WILK F., HOUTERMAN P., MOLTOFF J., HANS F., DEKKER F., VAN DEN HEUVEL J.F.J.M., HUTTINGA H., GOLDBACH R.,** 1997. Expression of the Potato leafroll virus ORF 0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 153-159.
- VAN DILLEWIJN C.,** 1960. *Botanique de la canne à sucre*. Hoveenman et Zonen N.V., Amsterdam, Netherlands, 321 p.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L. (Eds), 2000. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic press, New-York, USA, pp 775-790.

VEGA J., SCAGLIUSI S.M.M., ULIAN E.C., 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. *Plant Disease*, 81 (1): 21-26.

WALKER D.I.T., 1987. Breeding for disease resistance. *In HEIZ D.J. (Eds)*, 1987. Sugarcane improvement through breeding. Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp 455-502.

ZIEGGLER-GRAFF V., BRAULT V., MUTTERER J.D., SIMONIS M.T., HERRBACH E., GUILLEY H., RICHARDS K.E., JONARD G., 1996. The coat protein of Beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 501-510.

ANNEXES

1/ Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur quatre sites de prélèvements

2/ Composition de milieu MS (culture de méristèmes)

3/ Composition de milieu LB (culture de bactéries)

Annexe 1 : Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur quatre sites de prélèvement

Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur la station de La Mare pendant une période de 30 mois

Age (repousse)	Cultivars			Moyenne	Ecart-type
	R570	R575	R579		
10 mois (vierge) *	18 **	100	35	51.0	35.34
5 mois (1 ^{ère} repousse)	20	97	21	46.0	36.06
10 mois (1 ^{ère} repousse)	24	99	52	58.3	30.94
5 mois (2 ^{ème} repousse)	22	92	50	54.7	28.77
10 mois (2 ^{ème} repousse)	16	100	27	47.6	37.28
5 mois (3 ^{ème} repousse)	20	100	51	57.0	32.93
Moyenne	20.0	98.0	39.3		
Ecart-type	2.58	2.89	12.36		

Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur la station de Savanna pendant une période de 30 mois

Age (repousse)	Cultivars			Moyenne	Ecart-type
	R570	R575	R579		
10 mois (2 ^{ème} repousse) *	50 **	100	52	67.3	23.11
5 mois (3 ^{ème} repousse)	38	100	66	68.0	25.35
10 mois (3 ^{ème} repousse)	32	99	44	58.3	29.17
5 mois (4 ^{ème} repousse)	34	95	40	56.3	27.45
10 mois (4 ^{ème} repousse)	41	98	47	62.0	25.57
5 mois (5 ^{ème} repousse)	48	100	72	73.3	21.25
Moyenne	40.5	98.7	53.5		
Ecart-type	6.68	1.80	11.66		

Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur la station de Saint-Benoît (parcelle I) pendant une période de 12 mois

Age (repousse)	Cultivars			Moyenne	Ecart-type
	R570	R575	R579		
10 mois (2 ^{ème} repousse) *	94 **	100	90	94.7	4.11
5 mois (3 ^{ème} repousse)	97	100	92	96.3	3.30
10 mois (3 ^{ème} repousse)	87	92	73	84.0	8.04
Moyenne	92.7	97.3	85.0		
Ecart-type	4.19	3.77	8.52		

Evolution des taux d'infection par le SCYLV de trois cultivars de canne à sucre sur la station de Saint-Benoît (parcelle II) pendant une période de 24 mois

Age (repousse)	Cultivars			Moyenne	Ecart-type
	R570	R575	R579		
10 mois (1 ^{ère} repousse) *	72 **	98	43	71.0	22.46
5 mois (2 ^{ème} repousse)	83	100	52	78.3	19.87
10 mois (2 ^{ème} repousse)	76	97	61	78.0	14.76
5 mois (3 ^{ème} repousse)	61	95	40	65.3	22.66
10 mois (3 ^{ème} repousse)	75	100	36	70.3	26.34
Moyenne	73.4	98.0	46.4		
Ecart-type	7.17	1.90	9.00		

* date de prélèvement entre 9 et 11 mois, ** pourcentage de feuilles infectées par le SCYLV (échantillonnage de 100 feuilles F1 par cultivar et par date de prélèvement)

Annexe 2 : Composition du milieu MS (culture de méristème)**MACROÉLÉMENTS**

NH ₄ NO ₃	10 g
KNO ₃	10 g
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,715 g
KH ₂ PO ₄	3 g
KCl	0,65 g
H ₂ O qsp	1 l

MICROÉLÉMENTS

H ₃ BO ₃	1400 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	380 mg
KI	75 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ , O ₂₄ , 4H ₂ O	10 mg
Cu(NO ₃) ₂ , 3H ₂ O	35 mg
H ₂ O qsp	100 ml

FER-EDTA

FeSO ₄ , 7H ₂ O	5,56 g
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	7,46 g
H ₂ O qsp	1 l

VITAMINES

Acide nicotinique	50 mg
Pyridoxol hydrochloride	10 mg
Myoinositol	10 g
Thiamine dichloride	10 mg
H ₂ O qsp	100 ml

MILIEU

Macroéléments	100 ml
Microéléments	1 ml
Fer-EDTA	5 ml
Vitamines	2 ml
Phytigel (si milieu solide)	3 g
Saccharose	40 g
Charbon actif (pour méristème)	3,5 g
H ₂ O qsp	1 l

pH : 5,8

Annexe 3 : Composition du milieu LB (culture d'*Escherichia coli*)

Bacto-tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
H ₂ O qsp	1 l

LISTE DES PUBLICATIONS

- **PUBLICATIONS DANS DES REVUES SCIENTIFIQUES A COMITE DE LECTURE**

RASSABY L., GIRARD J-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., ROTT P., 1999. Survey of sugarcane yellow leaf syndrome in Réunion Island. *Sugar Cane*, 99: 16-18.

- **PUBLICATIONS A PARAITRE**

RASSABY L., GIRARD J-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., KODJA H., COSTET L., ROTT P., 2001. Progress of SCYLV infection rates in sugarcane grown in Réunion Island.

RASSABY L., GIRARD J-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., LETOURMY P., KODJA H., ROTT P., 2001. Impact of SCYLV on sugarcane yield in Réunion Island.

RASSABY L., ROYER M., BORG Z., SMITH G.R., PERRIER X., ROTT P., 2001. Genetic diversity of SCYLV isolates from several countries and especially from Réunion Island.

- **COMMUNICATIONS A DES CONGRES ET ATELIERS DE TRAVAIL**

- ✓ **COMMUNICATIONS ORALES**

RASSABY L., GIRARD J-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., KODJA H., ROTT P., 2000. Dynamics of *Sugarcane yellow leaf virus* in commercial varieties of Réunion Island. In Abstracts of International Society of Sugar Cane Technologists Pathology workshop, 17-23 July 2000, Chiang Mai, Thailand, 6: Ph-5.

RASSABY L., GIRARD J.-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., KODJA H., ROTT P., 2001. Yellow leaf syndrome in sugarcane cultivars of Réunion Island: dynamics of SCYLV in the plant and in the field. In Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists Congress, 16-21 September 2001, Brisbane, Australia, 24: 451-455.

- ✓ **POSTERS**

RASSABY L., GIRARD J.-C., IREY M.S., LOCKHART B.E.L., KODJA H., ROTT P., 2001. Dynamique du *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) dans les variétés commerciales de canne à sucre à La Réunion. 8èmes rencontres en virologie végétale d'Aussois, 11-15 mars 2001, Aussois, France, p 19.

ABSTRACT

This report describes studies undertaken on yellow leaf syndrome which is caused by the *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). The aim was to determine the impact of the virus on the main sugarcane cultivars in Reunion Island, to study the progress of virus populations in the plant and in the field, to analyze the dissemination of the disease on the island and to characterize the genetic variability of SCYLV in Reunion Island in comparison with isolates of the virus sampled from other geographical locations.

The agronomic characteristics of both infected and non-infected sugarcane were compared in a field experiment on three sugarcane cultivars (R570, R577 and R579) which occupy more than 90% of the cultivated sugarcane area in Reunion. Significant losses in tonnage (23%) and in sugar (11%) were noted in plant crop for the cultivar R577 but not for either of the two other cultivars. In addition, even though a non-negligible proportion of leaf yellowing observed here was caused by other factors, a significant percentage (10 to 60% depending on the cultivar) could be attributed to SCYLV. The most severe yellowing symptoms were linked to the presence of the virus in the plant.

From 1998-2000, an investigation was conducted to determine the progress of yellow leaf syndrome in Reunion Island sugarcane fields. The presence of SCYLV in cultivars R570, R575 and R579 was confirmed by tissue blot immunoassay (TBIA). The percentage of infected stalks varied according to the cultivar and the sampling site but stayed relatively stable during a 30 month period. In all the growing areas, R575 was the most infected (98%) cultivar. The percentages of infection for R570 and R579 were 50% and 52%, respectively. These results suggest that in Reunion Island 1/ the level of resistance to yellow leaf syndrome varies as to cultivar, 2/ the infected sugarcane stools do not recover from the disease after harvesting and 3/ the virus is principally propagated by planting infected cuttings and not by insect vectors.

The dynamics of SCYLV in sugarcane was studied with cuttings taken from four cultivars (R570, R575, R577 and R579) using two different techniques (TBIA and RT-PCR) for detection of the virus. One month after germinating infected cuttings in an insect proof greenhouse, the virus could be found in all leaves, stalks and roots regardless of the cultivar. The distribution of SCYLV in the entire plant did not vary during a 10 to 11 month period of growth.

Two species of aphids have been identified on sugarcane in Reunion Island i.e. *Melanaphis sacchari* and *Rhopalosiphum maidis*. SCYLV has only been found, by the use of RT-PCR, in aphid colonies of *Melanaphis sacchari*. Two months after planting virus-free plants of the susceptible cultivar R575 in a location infested with the virus, 14% of the plants were infected by SCYLV. Six months later, the total had reached 24% with new infections essentially coming from secondary contaminations. It therefore appears that, in Reunion Island, a small window of time (between 0 and 2 months after planting cuttings) exists for which primary infection can take place.

The genetic variability of SCYLV was analyzed using 48 virus isolates from Reunion Island and 24 isolates from other countries. One fragment from each of the six ORFs in the genome was amplified by RT-PCR, cloned and then sequenced. Phylogenetic analysis of the obtained sequences showed that the most variable regions of SCYLV are in ORF 1 which codes for a multifunctional protein and ORF 2 which codes for the replicase. On the other hand, the region the most conserved is ORF 3 which codes for the capsid protein. Depending on the region observed, the virus isolates were classified into two to four phylogenetic groups. Based on the variability of the entire genome, the majority of isolates from Reunion Island were different from the isolates from other origins. Four isolates from Reunion Island were, however, very close to these foreign isolates, which suggests that SCYLV was introduced to Reunion Island from another country and that one particular genotype evolved and spread on the island.

Keywords : genetic variability, Reunion Island, sugarcane, *Sugarcane yellow leaf virus*, transmission, yellow leaf syndrome, yield

RÉSUMÉ

Des recherches ont été menées sur le syndrome de la feuille jaune causé par le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) dans le but de déterminer l'impact du virus sur les principaux cultivars de canne à sucre à La Réunion, d'étudier l'évolution des populations virales dans la plante et au champ, d'analyser la dissémination de la maladie sur l'île et de caractériser la variabilité génétique du SCYLV à La Réunion en comparaison avec des isolats d'autres origines géographiques.

Les caractéristiques agronomiques de cannes à sucre infectées ou non par le SCYLV ont été comparées dans une expérimentation au champ avec trois cultivars de canne à sucre couvrant plus de 90% de la sole cannière à La Réunion : R570, R577 et R579. Des pertes significatives de la production en tonnage (23%) et en sucre (11%) ont été mises en évidence dès le premier cycle de récolte pour le cultivar R577, mais pas pour les deux autres cultivars. De plus, malgré une proportion non négligeable de jaunissements foliaires causés par des facteurs divers, un pourcentage important de jaunissements (10 à 60% selon le cultivar) a pu être attribué au SCYLV. Les symptômes les plus sévères sont essentiellement liés à la présence du virus dans la plante.

Une enquête a été conduite de 1998 à 2000 pour déterminer la progression du syndrome de la feuille jaune dans les champs de canne à sucre à La Réunion. Le SCYLV a été recherché dans trois cultivars (R570, R575 et R579) par la technique des immuno-empreintes (IE). Les pourcentages de tiges infectées ont varié selon le cultivar et selon le site de prélèvement, mais sont restés relativement stables sur une période de 30 mois. Toutes zones de culture confondues, le cultivar R575 est le plus infecté (98%) et les cultivars R570 et R579 les moins infectés (50 et 52% respectivement). Ces résultats suggèrent qu'à La Réunion 1/ le niveau de résistance au syndrome de la feuille jaune diffère en fonction des cultivars, 2/ les souches de canne à sucre infectées ne récupèrent pas de la maladie après la récolte et 3/ le virus est principalement propagé par la plantation de boutures infectées et non par l'intermédiaire d'insectes vecteurs.

La dynamique du SCYLV dans la canne à sucre a été étudiée à l'aide de boutures de quatre cultivars (R570, R575, R577 et R579) et deux techniques de détection (IE et RT-PCR). Un mois après la germination des boutures infectées en serre étanche aux insectes, le virus a été retrouvé dans toutes les feuilles, tiges et racines quel que soit le cultivar. Cette distribution du SCYLV dans toute la plante n'a pas varié pendant une période de croissance des plantes de 10 à 11 mois.

Deux espèces de pucerons ont été identifiées sur canne à sucre à La Réunion : *Melanaphis sacchari* et *Rhopalosiphum maidis*. La présence du SCYLV a été mise en évidence par RT-PCR uniquement dans des colonies de pucerons de *Melanaphis sacchari*. Deux mois après la plantation du cultivar sensible R575 indemne de SCYLV dans une zone infestée par le virus, 14% des plantes étaient infectées par le SCYLV. Six mois plus tard, ce taux était de 24% et les nouvelles infections étaient essentiellement dues à des contaminations secondaires. Il existerait donc à La Réunion une fenêtre réduite de contaminations primaires qui serait située entre 0 et 2 mois après la plantation des boutures au champ.

La variabilité génétique du SCYLV a été analysée avec 48 isolats viraux de La Réunion et 24 isolats originaires d'autres pays. Une partie de chacun des six ORFs du génome a été amplifiée par RT-PCR, clonée puis séquencée. L'analyse phylogénétique des séquences obtenues a permis de montrer que les régions les plus variables du SCYLV sont l'ORF 1 codant pour une protéine multifonctionnelle et l'ORF 2 codant pour la polymérase. En revanche, la région la plus conservée est l'ORF 3 codant pour la protéine de capsid. Selon la région du génome, les isolats viraux ont été classés en deux à quatre groupes phylogénétiques. En se basant sur la variabilité de l'ensemble du génome, la grande majorité des isolats de la Réunion se différencient des isolats d'autres origines. Quatre isolats de la Réunion sont cependant très proches de ces isolats étrangers, ce qui suggère que le SCYLV a été introduit à la Réunion à partir d'un pays tiers et qu'un génotype particulier s'est développé et installé sur l'île.

Mots-clés : canne à sucre, La Réunion, rendement, *Sugarcane yellow leaf virus*, syndrome de la feuille jaune, transmission, variabilité génétique