

Récents progrès dans la lutte contre la sharka des arbres fruitiers à noyau

Michel Ravelonandro, Jean Dunez

La maladie virale de la sharka des arbres fruitiers a été observée pour la première fois en Bulgarie en 1932 [1] ; elle est apparue très vite redoutable par les symptômes développés par les arbres atteints et sa capacité à se disséminer naturellement. La maladie s'est étendue à toute l'Europe et on la retrouve en Égypte [2] et au Moyen-Orient (Turquie, Syrie, Chypre) (figure 1). Tout récemment, on a rapporté la présence de ce virus au Chili [3]. En France, ce sont les régions de Provence, Rhône-Alpes et des Pyrénées-Orientales qui sont affectées par cette maladie. En Europe, des centaines de millions d'arbres fruitiers à noyau appartenant aux espèces Abricotier, Pêcher et Prunier sont atteints et, très souvent, leur production est impropre à la commercialisation. Des cas d'infection ont été signalés sur Amandier et, très récemment, sur Cerisier (*Verderevskaya*, communication personnelle) ; ces derniers résultats restent cependant à confirmer et l'impact agronomique et épidémiologique éventuel de telles infections à préciser. Sur Abricotier, Pêcher et Prunier, la sharka s'extériorise sur les feuilles des arbres atteints par des éclaircissements du limbe le long des nervures secondaires et tertiaires, et par des taches ou/et des anneaux clairs particulièrement marqués chez certaines variétés fruitières [4].

Les symptômes sur fruits consistent en décolorations et déformations. Sur Pêcher, ils se limitent en général à des décolorations en forme de taches ou d'anneaux (photo 1). Sur Abricotier, ils s'accompagnent de déformations qui peuvent être très fortes. Sur Prunier, les déformations s'accompagnent souvent de nécroses internes et de dépôts de gomme et, dans certaines variétés, d'une réduction de la teneur en sucre et d'une augmentation de l'acidité.

Chez certaines variétés de pruniers, mais aussi de pêchers, l'infection par la sharka conduit à une chute des fruits bien avant la maturité.

Dans les régions où elle sévit, la sharka a un impact économique considérable sur la production fruitière car une partie importante de la récolte n'est pas commercialisable. Elle peut même avoir des retombées sociologiques, dans la mesure où elle risque de conduire à l'abandon des cultures traditionnellement associées à certaines régions : l'impossibilité de vendre les fruits atteints et l'éradication des arbres infectés peuvent ainsi déstabiliser l'équilibre socio-économique des zones affectées, dont l'économie et une partie importante de l'emploi reposent sur ces productions fruitières. De plus, un pays dont une région est atteinte par la sharka peut être mis à l'index, compromettant ainsi les exportations de matériel végétal fruitier, même si celui-ci est sain.

Des études menées dans les pays infectés et souvent réalisées dans le cadre de collaborations internationales ont permis d'analyser la sensibilité variétale de très nombreuses variétés. Aucune variété de

pêcher ou de prunier n'est apparue résistante et ce n'est que récemment que quelques variétés d'abricotiers ont montré une très bonne résistance au virus.

Pendant de longues années, la lutte contre la maladie a été centrée sur l'éradication dans les zones peu infectées, où elle peut être efficace, et sur la culture de variétés sensibles au virus mais présentant peu ou pas de symptômes en cas d'infection, là où l'éradication n'était pas possible.

La sharka est induite par un virus dont l'appartenance au groupe des Potyvirus a été montrée dès 1975. Ce virus est transmis par différentes espèces de pucerons, ce qui rend son contrôle très difficile. L'existence de souches différentes du virus a été montrée sur la base de leurs propriétés biologiques [5] et confirmée sur la base de leurs propriétés sérologiques [6] et, plus récemment, par l'étude de la structure de leur génome [2].

Bien que de nombreuses variétés extériorisent des symptômes, d'autres demeurent sans symptômes en cas d'infection. Les études épidémiologiques, les travaux d'amélioration des plantes pour la résistance, le contrôle du matériel de reproduction et des introductions nécessitent des techniques de diagnostic précises. Le diagnostic a d'abord été fondé sur la transmission par greffe à des variétés sensibles exprimant rapidement des symptômes foliaires, puis sur les tests sérologiques (notamment la technique Elisa : *enzyme-linked immunosorbent assay*) et, plus récemment, sur des techniques moléculaires.

Le diagnostic et la lutte ont fait, dans les dix dernières années, des progrès consi-

M. Ravelonandro, J. Dunez : Inra, Station de pathologie végétale, Centre de recherches de Bordeaux, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon, France.

Tirés à part : J. Dunez

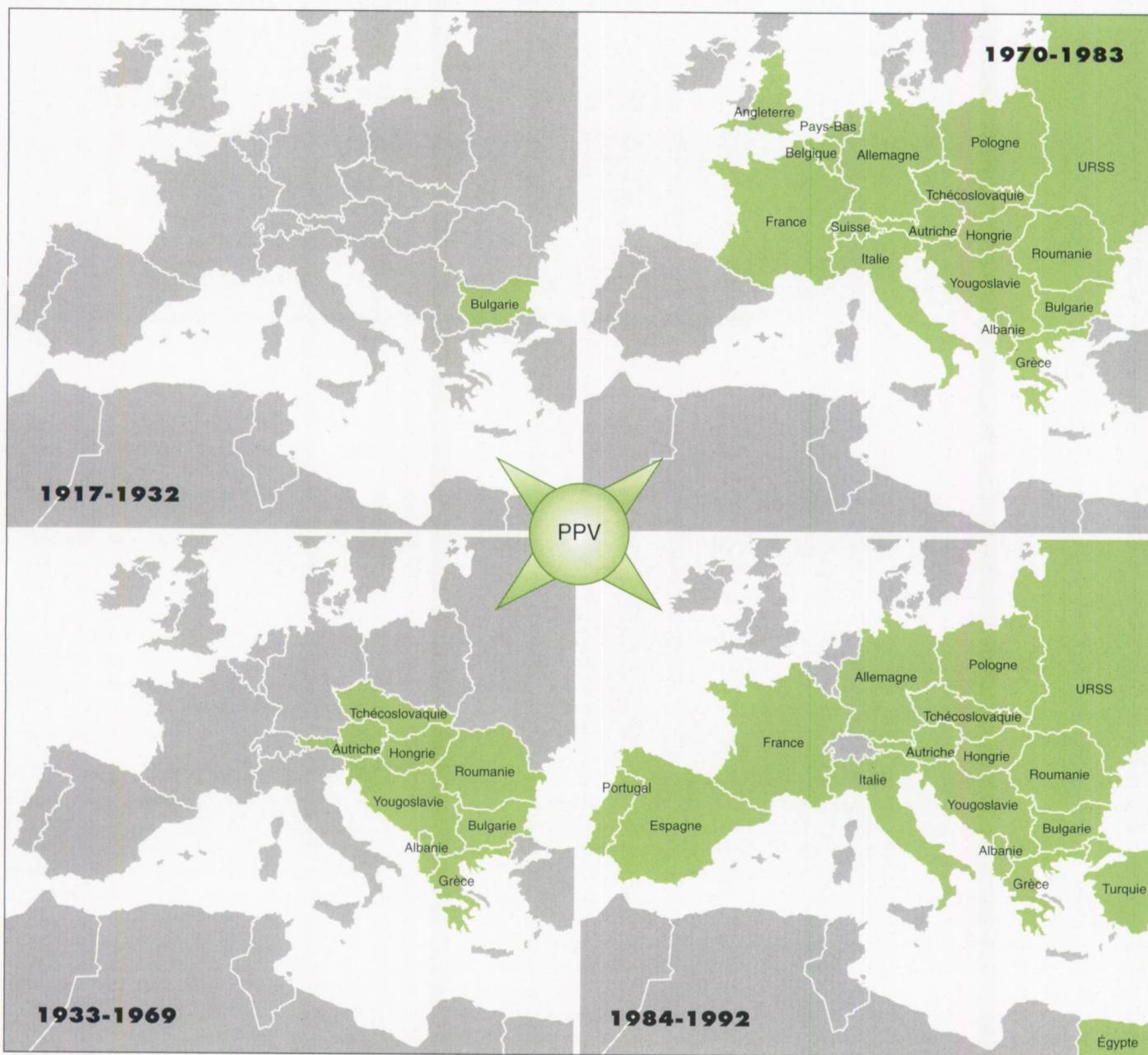


Figure 1. Chronologie de la mise en évidence de la sharka.

Figure 1. Distribution of sharka disease in Europe.

dérables grâce à l'analyse de la structure du génome viral [7-9]. Des outils remarquables ont été produits : ADNc synthétiques infectieux [10, 11] pour l'analyse du pouvoir pathogène, sondes moléculaires ADNc ou ARN [12-14] pour la détection du virus, plantes transgéniques herbacées résistantes au virus [15, 16] et plantes transgéniques ligneuses ayant intégré le gène codant pour la protéine de capsid du virus [17, 18].

Nous entrons actuellement dans une

phase de progrès remarquables dans la connaissance de ce virus. Nous diviserons cette présentation en trois volets majeurs. Le premier présentera les résultats obtenus, ces dernières années, dans la connaissance du génome viral, le deuxième sera consacré à l'évolution des techniques de diagnostic et le dernier mettra en relief les récents développements en matière de lutte et les espoirs que l'on peut maintenant avoir pour limiter la diffusion et l'impact du virus de la sharka.

Le virus de la sharka : structure et expression du génome

Le virus de la sharka (*plum pox virus*, PPV) appartient au groupe des Potyvirus et est transmis par des pucerons selon le

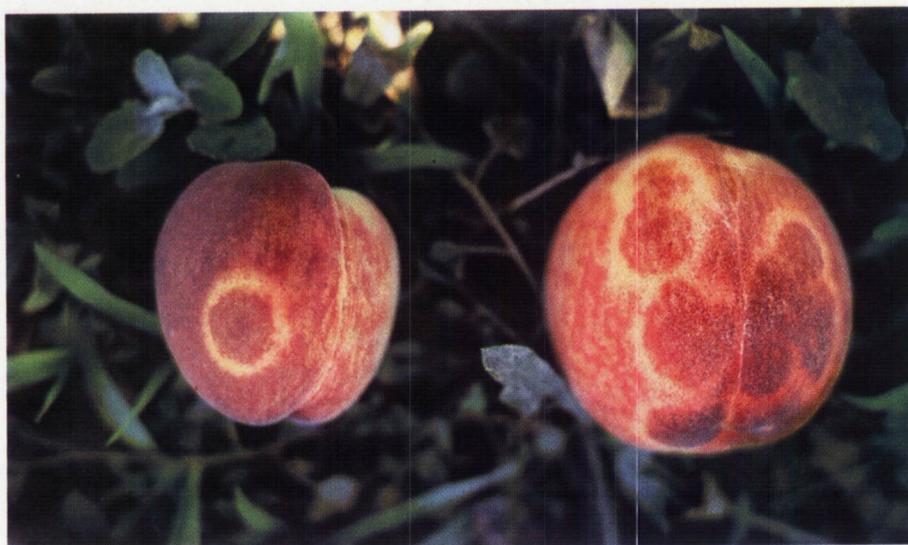


Photo 1. Symptômes de la sharka sur les pêches.

Photo 1. Symptoms in peaches due to plum pox virus.

mode non persistant, c'est-à-dire qu'il est véhiculé de plante en plante grâce à l'accrochage de particules virales aux stylets du puceron et qu'aucun traitement contre ces insectes n'est efficace. C'est un virus qui possède une large gamme d'hôtes à la fois ligneux et herbacés [4]. Il a pu être transmis expérimentalement par voie mécanique à des plantes herbacées (*Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Pisum sativum*...). Des différences entre souches ont été montrées [5] consécutivement à l'inoculation de différentes origines de PPV sur *C. foetidum*.

Ultérieurement, cette variabilité des souches de PPV a été confirmée sérologiquement et deux souches de PPV (PPV D et PPV M) ont été identifiées

[6]. Les différences entre les souches D et M ont été récemment retrouvées par des techniques moléculaires de PCR combinée à une étude RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) [19]. Dans les dernières années, on a aussi découvert deux souches nouvelles : PPV EA (El Amar) [2], identifiée en Égypte, et PPV 06, un isolat qui apparaît comme étant la résultante d'une recombinaison entre les deux souches D et M de PPV [20].

La particule virale du PPV

Le PPV est constitué de particules flexueuses de 700 nanomètres de long et de 12 nanomètres de diamètre [21]. Ces particules sont des nucléoprotéines constituées d'un acide ribonucléique

enveloppé par la protéine de capside. La capside est constituée d'environ 2 000 sous-unités protéiques identiques ayant une masse moléculaire de 36 000 daltons [22]. Ces sous-unités protéiques sont arrangées selon une symétrie hélicoïdale. Les séquences d'acides aminés de la protéine de capside de huit souches de PPV sont actuellement connues [20, 23]. À côté de six souches qui ont d'importantes homologues (96-98 %), trois souches se démarquent, PPV EA, PPV 06 et PPV SK 68 [23] par des différences au niveau de l'extrémité amino-terminale.

Le génome viral du PPV

La particule virale contient 5 % d'ARN. C'est un ARN de 3,5.10⁶ daltons, de polarité positive, c'est-à-dire une molécule infectieuse. Il comporte, à son extrémité 5', une protéine Vpg (protéine liée au génome) et à son extrémité 3', une queue polyadénylée. Cet ARN de 9 800 nucléotides a été complètement séquencé pour plusieurs souches de PPV [7-9, 23].

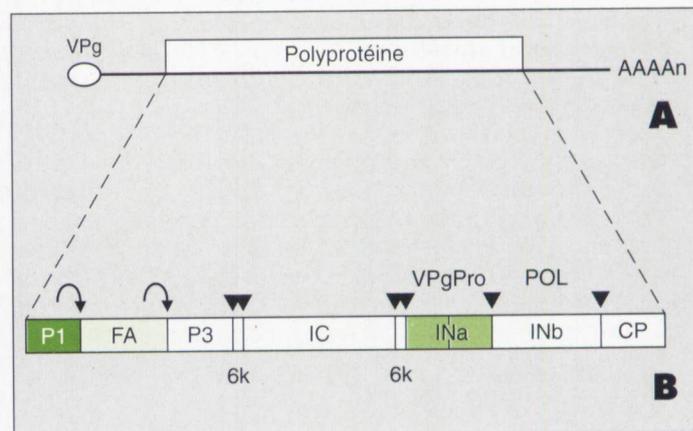
Le génome du PPV s'exprime sous forme d'une polyprotéine de 350 kilodaltons qui est clivée par trois protéases virales : la protéase de l'inclusion nucléaire INa [24], la protéase P1 et le facteur assistant (FA) [25]. Dix protéines virales putatives résultent de la maturation de cette grande polyprotéine (figure 2). De l'extrémité amino à l'extrémité carboxy-terminale, on distingue la protéine P1 (suspectée d'être la protéine impliquée dans la diffusion du virus de cellule à cellule), le facteur assistant de la transmission par les pucerons (FA), la P3 (fonction inconnue), deux protéines ayant un poids moléculaire apparent de

Figure 2. Organisation et expression du génome du virus de la sharka.

L'ARN génomique, muni d'une protéine VPg à son extrémité 5' et d'une queue polyadénylée à son extrémité 3' (A), code pour une polyprotéine qui est clivée par 3 protéases virales : la protéase P1, la protéase-facteur assistant et la protéase INa (inclusion nucléaire a ou Vpg-Pro) (B). Les sites de clivage des 2 protéases N-terminales sont annotés respectivement par des flèches tandis que ceux de la protéase INa sont indiqués par un triangle.

Figure 2. Genetic map of plum pox virus RNA.

The viral genome contains a Vpg protein (viral protein linked to the genome) at its 5' end and a poly-A tail at its 3' end (A). PPV RNA is transcribed into a large polyprotein which is processed by three virus-encoded proteases: P1-, HC- and INa-Pro (B). The cleavage sites of P1 and HC-Pro are indicated by arrows, those of INa-Pro by triangles.



Summary

Recent progress in the control of sharka disease in kernel fruit trees

M. Ravelonandro, J. Dunez

Plum pox (sharka), is one of the major plant virus diseases affecting kernel fruit. Due to its considerable impact, the disease is a serious threat to countries still free of the virus. In Europe, millions of kernel fruit trees are infected, and crop production is often unmarketable.

Sharka disease was first identified in Bulgaria sixty years ago and has gradually spread all over Europe. The causative agent is a virus of the Potyvirus group, which infects apricot, peach and plum trees. Recently, plum pox virus (PPV) has also been reported on cherry trees (sweet and sour). To confirm whether the cherry tree can actually host the virus, develop symptoms, and be a source of infection for aphid transmission, investigations are required. Similarly, PPV strains infecting the cherry tree should be compared to other known strains infecting apricot, peach or plum trees.

Although the impact of PPV is especially high in Europe, the virus has been also reported in the Near East, Egypt and, recently, in Chile. It is a very serious threat for any country involved in fruit tree production. Countries in which PPV has not as yet been identified apply very strict controls to prevent introduction of this virus.

Research has been conducted on the disease characteristics and conditions of natural spread. Knowledge of the causal agent's biological properties have allowed biological/serological tools and molecular detection techniques to be developed. For many years, disease control was based on eradication and prevention. In countries where eradication was not possible due to the high infection level, tolerant cultivars were developed.

The tremendous progress in molecular biology over the past fifteen years has allowed the development of new approaches to disease control, some of which applicable to PPV.

Firstly, the virus genome was transcribed into complementary cDNA, cloned onto an E. coli plasmid and analysed to determine the viral genome structure. The cDNA was used to develop molecular DNA probes, or transcribed into RNA probes. Specific oligonucleotide primers have recently been used in PCR (polymerase chain reaction) detection of the viral genome. The cDNA molecules have been also used as gene sources for transfer into plants. Transgenic plant models expressing the PPV coat protein gene showed resistance to PPV, and transgenic apricot and plum trees containing the PPV coat protein gene are currently investigated for their viral resistance.

Over the past ten years, certain PPV-resistant varieties have been identified in the apricot and a number of wild Prunus species, and have been used for intra- and interspecific crossings. The resulting hybrids are under investigation and commercial apricot hybrids with good resistance to PPV could be available in the near future. Hence, with today's strategies using various technologies, the spread of PPV could be limited and the economical impact of sharka disease reduced.

Cahiers Agricultures 1995 ; 4 : 153-61.

6 kilodaltons qui encadrent l'inclusion cylindrique (IC) qui a une activité hélicase et est liée à la replication. On trouve ensuite les protéines d'inclusion nucléaire « a » [INa] (protéine VPg protéase Pro) et « b » [INb] (polymérase Pol) et la protéine de capsid (CP). L'ARN du PPV a été cloné totalement et transcrit en molécules synthétiques infectieuses [10, 11], permettant ainsi l'analyse des bases moléculaires des propriétés biologiques du virus. Le rôle joué par certaines de ces protéines a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* de façon certaine : l'IC a une fonction hélicase [26], les protéines INA et FA ont des activités protéases. Outre son activité protéase, FA est un des deux éléments liés à la spécificité de transmission du virus par les pucerons ; le second est la protéine de capsid : la perte des 15 acides aminés N-terminaux de la protéine de capsid abolit la transmission du virus par les pucerons [8].

La possibilité de détecter différentes inclusions (IC et INa) à partir d'extraits de plantes infectées a été récemment démontrée [27]. Chez divers potyvirus, le FA est, d'une manière fréquente, associé à des corps d'inclusion amorphe (IA) : dans le cas du virus de la sharka, cette protéine apparaît soluble [25].

Détection du virus de la sharka

Les techniques de diagnostic sont au centre de la lutte contre la maladie, qu'elles soient une base aux études épidémiologiques, à l'évaluation de la sensibilité variétale, un soutien aux programmes d'amélioration pour la résistance ou le support de l'évaluation sanitaire du matériel végétal dans les échanges internationaux.

Le diagnostic a d'abord été fondé sur l'utilisation de variétés indicatrices ligneuses inoculées par greffe. Différentes variétés ont, ainsi, été utilisées au champ (*Prunus domestica* var. *Pozegaca*, *Prunus mariana* GF 8-1, semis de pêcher GF 305 ou de la variété Elberta [28]) ou en serre (le semis de pêcher GF 305 y développe des symptômes foliaires caractéristiques en 3 à 4 semaines).

Les techniques sérologiques, et notamment la technique Elisa [29], ont été très largement appliquées à la détection du

PPV. Cette détection se heurte à deux types de problèmes : la faible concentration de virus dans les plantes infectées et sa distribution très irrégulière. Le test Elisa, notamment lorsqu'il est utilisé pour un indexage de masse, peut se révéler insuffisant.

La connaissance moléculaire du génome du virus a été la base d'améliorations substantielles apportées au diagnostic du PPV. Elle a, dans un premier temps, permis le développement des techniques de détection par hybridation moléculaire utilisant des sondes moléculaires ADN ou ARN [12-14].

Dans les meilleures conditions, l'application de l'hybridation moléculaire avec des sondes ARN radiomarquées permet de détecter 500 picogrammes de virus par millilitre d'échantillon infecté, soit huit fois moins qu'Elisa. Plus récemment, le couplage de la transcription inverse de l'ARN viral à l'amplification par PCR du produit obtenu a permis la détection de 0,2 picogramme de virus par échantillon infecté. Néanmoins, compte tenu de la petite taille de l'échantillon (1 µl), la sensibilité de cette réaction, exprimée en concentration décelée, est de 200 picogrammes par millilitre, soit à peine meilleure que celle de l'hybridation. La technique a été perfectionnée par un couplage avec une phase initiale de capture du virus dans un échantillon végétal de 100 microlitres par les anticorps spécifiques du PPV. Grâce à cette technique d'immunocapture PCR (IC/PCR) [30], il est possible de déceler 0,2 picogramme de virus par millilitre, ce qui représente une sensibilité 4 000 fois supérieure au test Elisa. Dans des applications en routine, cette technique a montré son intérêt pour la détection du virus dans des échantillons de différentes natures, y compris dans des baguettes de bois en dormance, ce qui est particulièrement intéressant pour les contrôles du matériel végétal dans les échanges internationaux.

Trois souches de virus avaient été décrites [5] sur la base de la symptomatologie sur une plante herbacée, *Chenopodium foetidum*. La réaction d'indicateurs ligneux permet de différencier des types différents sans pouvoir cependant associer ce typage à la sévérité des symptômes au verger. En 1979, sur la base des caractéristiques sérologiques, Kerlan et Dunez [6] ont décrit les deux souches M et D. L'analyse des amplifiats après digestion avec des enzymes de restriction permet de séparer clairement les types M

et D [20]. Bien que difficiles à différencier par leur symptomatologie au verger, les types M et D paraissent présenter des caractéristiques épidémiologiques et, notamment, des dynamiques de dissémination différentes, et il est d'intérêt majeur de pouvoir les différencier. Outre l'analyse RFLP des amplifiats, il est aussi possible de différencier ces souches par des différences de mobilité électrophorétique de leur protéine de capsid. Enfin, des anticorps monoclonaux ont pu être obtenus, dont certains paraissent capables d'identifier spécifiquement la souche D. Des essais sont en cours pour obtenir un résultat analogue avec la souche M.

Lutte génétique contre le virus de la sharka

Les stratégies fondamentales de la lutte contre le PPV reposent sur la prévention et l'éradication. La sélection sanitaire, c'est-à-dire la culture de plantes sans virus, est l'une des méthodes les plus utilisées : ses chances de succès sont liées au niveau d'infection de l'environnement. Parallèlement, l'éradication des arbres infectés a été couronnée de succès lorsqu'elle a été appliquée scrupuleusement et que les surfaces infectées étaient bien identifiées et relativement réduites. Ainsi, des pays tels que l'Angleterre, la Belgique, le Luxembourg, les Pays-Bas et la Suisse, sont parvenus à se débarrasser de la sharka (figure 1).

Dans les situations où la maladie ne peut être contrôlée par des méthodes prophylactiques et pour éviter la multiplication des sources d'infection consécutive à la culture de variétés sensibles présentant peu ou pas de symptômes, la lutte génétique représente l'ultime recours pour combattre ce virus. Des efforts importants ont été réalisés par les généticiens pour obtenir des variétés fruitières résistantes au virus. Ces travaux ont fait apparaître que très peu de *Prunus* contiennent des gènes de résistance naturelle contre ce virus [31, 32]. Les sources de résistance identifiées sur Abricotier [33] sont aujourd'hui la base de programmes d'amélioration de cette espèce pour la résistance par la voie d'hybridation intraspécifique. L'hybridation interspécifique semble également possible

pour introduire des résistances sur Pêcher et Prunier. Actuellement, quelques hybrides intraspécifiques d'Abricotier sont en cours d'évaluation pour leurs qualités agronomiques et commerciales et leur comportement à l'infection.

Lorsque les résistances naturelles sont rares, la transgénèse, exploitant des stratégies dérivées du pathogène, apparaît particulièrement intéressante. Il s'agit notamment de générer des plantes présentant un bon niveau de résistance par transfert et expression dans ces plantes, de séquences nucléiques virales et, en particulier, du gène codant pour la protéine de capsid.

Depuis les travaux de Powell Abel [34], qui rapportèrent pour la première fois que l'intégration du gène codant pour la protéine de capsid du virus de la mosaïque du tabac dans le génome de plants de tabacs conférerait à ces plantes une résistance au virus, de nombreux résultats, avec différents types de virus, ont confirmé l'intérêt d'une telle approche [35].

Dans le cas du virus de la sharka, l'ARN viral code pour une grande polyprotéine de 350 kilodaltons qui, par la suite, est clivée par trois protéases virales pour produire une protéine structurale (protéine de capsid) et des protéines non structurales (réplicase, protéase...). La manipulation du gène codant pour la protéine de capsid nécessite donc la localisation précise de ce gène sur le génome viral [22]. La séquence correspondante est alors isolée et clonée dans un vecteur d'expression [36]. La figure 3 illustre la stratégie suivie. Une construction génique contenant la copie de la séquence du gène de la protéine de capsid additionnée d'un codon d'initiation et d'une séquence « leader » a été fabriquée [36]. Cette construction génique a été ensuite clonée dans l'ADN-T (ADN de transfert) de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* et transférée en utilisant un système de transfert binaire. La souche d'*Agrobacterium* utilisée contient un plasmide Ti désarmé : ce plasmide Ti, délété de son ADN-T, ne peut, sous cette forme, assurer le transfert de gènes étrangers. Pour assurer ce transfert, il faut introduire un deuxième plasmide qui comporte un mini ADN-T contenant lui-même, entre les bordures droite (BD) et gauche (BG), la séquence que l'on souhaite transférer et une ou deux cassettes d'expression de gènes marqueurs, notamment les gènes exprimant la néo-

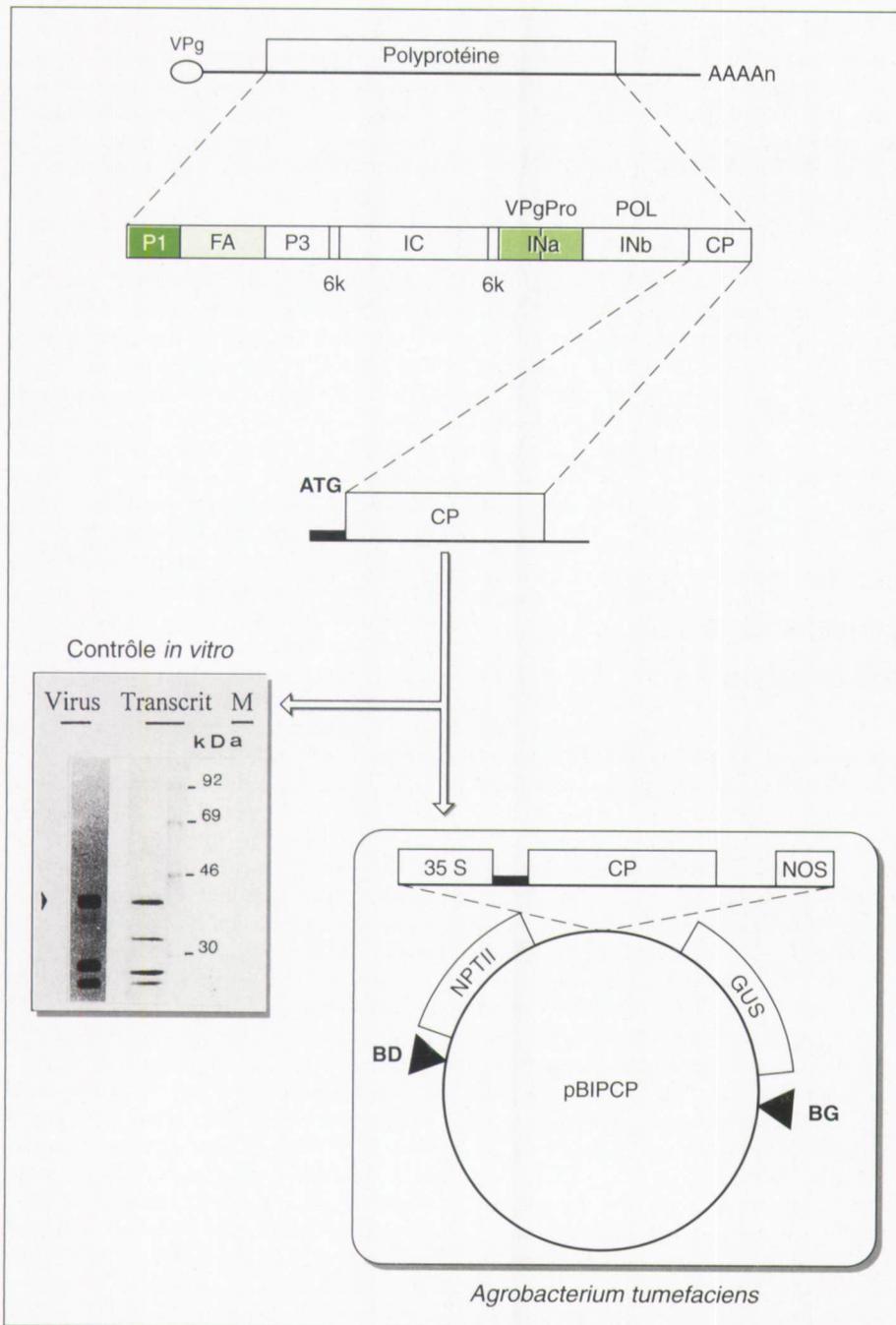


Figure 3. Représentation schématique de la démarche utilisée pour l'isolement et le transfert du gène codant pour la capsidie du virus de la sharka dans la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Dans l'encadré « Contrôle *in vitro* », la flèche noire note le niveau de migration de la capsidie protéique du virus de la sharka en gel de polyacrylamide dénaturant. La capsidie protéique synthétisée à partir de la construction génique (transcrit) comigre parfaitement avec celle de la sous-unité capsidiale (virus).

Figure 3. Diagrammatic representation of the strategy used for cloning the PPV CP gene into *Agrobacterium tumefaciens*.

In the insert « Control *in vitro* », polyacrylamide gel electrophoresis showing the PPV CP (indicated by the black arrow) produced via the synthetic mRNA transcripts, which comigrates with the capsid subunits resulting from virus denaturation.

mycine phosphotransférase II, NPTII (conférant la résistance à la kanamycine), et la β -glucuronidase, GUS (produit enzymatique d'origine bactérienne, utilisé comme un marqueur chromogénique qui transforme son substrat [X-glucuronide] en un produit de couleur bleue) (photo 2). L'intégration de la séquence virale se fait dans un site de clonage présent entre les deux gènes marqueurs.

Pour permettre son expression dans le génome de la plante, la construction génique a été placée sous la dépendance d'une séquence promotrice de type 35 S (séquence promotrice du transcrit ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur) et d'une séquence terminatrice (celle de la nopaline synthase) en vue de la stabilisation de l'ARNm résultant. Le messenger synthétique correspondant (ARNm du transgène) peut ensuite être exprimé et diriger la synthèse de la capsidie virale dans toutes les cellules de la plante transformée.

Obtention et comportement des plantes transgéniques

Les difficultés techniques rencontrées pour la transformation des variétés fruitières nous ont conduit à modéliser nos expériences chez une plante herbacée, *Nicotiana benthamiana*, qui est un hôte expérimental du virus de la sharka. Il présente le double avantage d'avoir un cycle végétatif court tandis que sa transformation par *Agrobacterium tumefaciens* et sa régénération sont bien maîtrisées.

En utilisant la technique de transformation de disques foliaires, des plantes transgéniques résistantes à la kanamycine, exprimant le gène GUS et contenant le gène codant pour la protéine de capsidie du virus de la sharka ont été obtenues. Ces plantes sont phénotypiquement identiques aux plantes non transformées. Après avoir analysé l'hérédité des gènes transférés, des plantes homozygotes appartenant à la génération F2 ont été évaluées vis-à-vis du virus de la sharka par inoculation mécanique : six jours après l'inoculation, 80 à 100 % des plantes inoculées (transgéniques ou non transgéniques) extériorisent la maladie

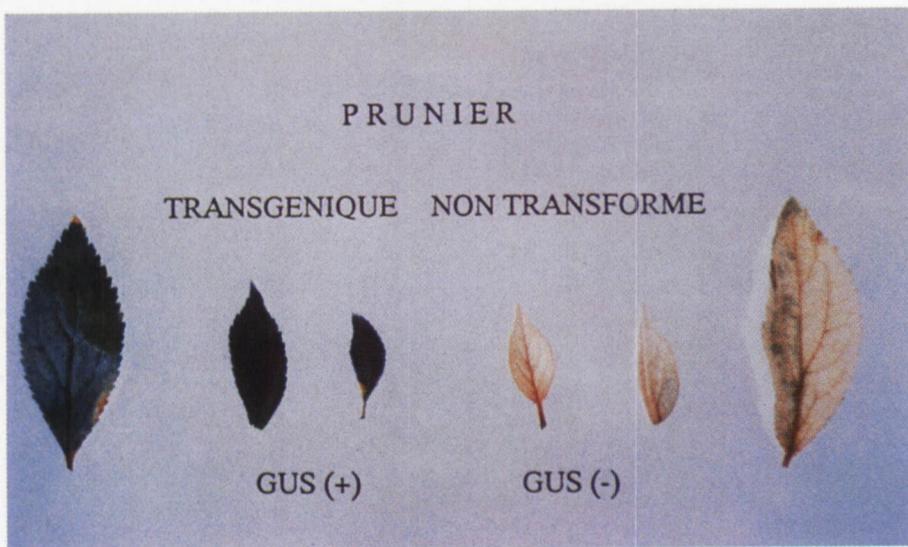


Photo 2. Comparaison des feuilles issues de pruniers transgéniques exprimant le gène codant pour la β -glucuronidase (GUS +) (limbe coloré en bleu) à celles qui proviennent de pruniers non transformés et qui n'expriment pas le gène GUS (GUS -) (limbe décoloré).

Photo 2. Comparison between the leaves of transgenic plums expressing GUS (blue-coloured) and those of non-transformed plants which are GUS (-) (colourless).

(déformation des jeunes feuilles des plantes infectées et jaunissement des nervures).

Une à deux semaines après l'inoculation, certaines lignées transgéniques récupèrent. Les jeunes feuilles des plantes témoins continuent à être déformées ou présentent une mosaïque forte alors qu'on observe, chez les lignées résistantes, un arrêt du développement des symptômes. L'absence de virus dans ces feuilles apparemment saines a été confirmée par les tests Elisa [16] et par le fait que les pucerons vecteurs ne peuvent y acquérir le virus. Des résultats similaires ont été obtenus par une équipe autrichienne chez une autre espèce, *Nicotiana clevelandii*, contenant le gène codant pour la capsid d'une souche non transmissible par les pucerons du virus de la sharka [15]. La résistance à la sharka chez ces plantes se traduit donc par un mécanisme de défense induit encore mal compris conduisant à une inhibition de la multiplication et de la généralisation du virus.

Cette première étape réalisée sur plante herbacée permettait de valider la stratégie avant d'entreprendre la transformation d'espèces fruitières. Un des obstacles majeurs repose ici sur la difficulté de transformer les arbres fruitiers à noyau. Contrairement à ce qui se passe chez les

plantes herbacées où les progrès technologiques ont permis la transformation de nombreuses espèces, les exemples de transformation et de régénération sont encore rares chez les espèces ligneuses.

Les deux exemples connus chez les espèces fruitières à noyau concernent la transformation de tissus immatures d'Abricotier [17] et de Prunier. Des pruniers transgéniques ont été obtenus à partir d'hypocotyles transformés par la bactérie *A. tumefaciens* hébergeant le gène codant pour la capsid du virus de la sharka [18]. Le contenu chromosomique des pruniers transformés a été analysé par amplification génique (PCR) avec des amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes intégrés (NPTII, GUS et protéine de capsid) : cette analyse a révélé la présence dans ces plantes des différents gènes portés par le mini ADN-T du plasmide, attestant clairement le caractère transformé de ces pruniers.

L'évaluation du comportement de ces plantes transgéniques est actuellement en cours, les tests d'inoculation étant réalisés par greffe avec des implants infectés et par les pucerons. Il faut noter que cette évaluation est réalisée sur des plantes au stade F0, contrairement aux études réalisées sur les plantes herbacées transformées qui étaient des plantes homozygotes pour

le gène capsid au stade F2. Dès maintenant, l'obtention de pruniers transgéniques représente une percée importante. Ces plantes forment des outils permettant, notamment, l'étude de la stabilité dans le temps de l'expression du transgène et de la protection induite ; elles doivent aussi permettre l'évaluation des risques liés à l'utilisation de cette stratégie et, en particulier, aux possibilités d'hétéroencapsidation démontrées avec les *Nicotiana benthamiana* transgéniques exprimant la capsid de la sharka [37].

Si les pruniers transgéniques obtenus présentent une résistance à la sharka, il restera alors à étendre ce travail aux différentes espèces sensibles au virus et aux différentes variétés commerciales, ce qui, compte tenu de la très large gamme de variétés cultivées de certaines espèces, notamment de pêcheurs, représentera une opération particulièrement lourde.

Conclusion et perspectives

Le virus de la sharka est responsable d'une des maladies majeures des espèces fruitières à noyau et représente une très grave menace pour l'arboriculture fruitière des régions qui ne sont pas encore atteintes.

L'impact de cette maladie vient de la très grande difficulté, voire de l'impossibilité, à empêcher, ou simplement à ralentir sa diffusion par les pucerons. Les niveaux d'infection atteints, notamment dans certaines régions d'Europe centrale et méditerranéennes, ont conduit à la culture de variétés tolérantes, infectées par le virus mais n'exprimant pas de symptômes : une telle stratégie est à double tranchant car elle permet la commercialisation de la récolte mais contribue à la propagation du virus.

Des progrès majeurs ont été réalisés sur la connaissance du PPV et de son génome, avec deux types de retombées majeures. La première est la mise au point de techniques de détection et de diagnostic particulièrement performantes. Celles-ci sont une aide à toutes les études épidémiologiques, à l'application des mesures de lutte prophylactique et aux programmes d'amélioration des plantes pour la résistance à ce virus. La seconde est la possibilité d'utiliser la stra-

tégie de résistance dérivée du virus pathogène pour l'expression du gène codant pour la protéine de la capsid du virus dans des plantes transformées. Cette stratégie, validée sur des plantes herbacées, a été transférée sur des *Prunus*. La réussite de la transformation et de la régénération des plantes exprimant les gènes introduits représente une percée en soi, les plantes transgéniques obtenues sont en cours d'évaluation pour leur comportement à l'infection. Parallèlement, quelques sources naturelles de résistance ont été mises en évidence et devraient conduire à disposer prochainement des premiers hybrides d'Abricotier ayant un bon niveau de résistance.

On peut donc très sérieusement espérer disposer, dans la décennie à venir, d'un nombre croissant de variétés de *Prunus* ayant un bon niveau de résistance à la sharka et conduisant, par là même, à une réduction de l'impact économique de la maladie et à une diminution progressive du taux d'inoculum.

La question nouvelle posée très récemment concerne la présence possible de virus de la sharka sur le Cerisier. Connue depuis plus de 60 ans et présente dans des régions fruitières exploitant également le Cerisier, la maladie n'avait jamais été observée sur cette plante et les études expérimentales réalisées avaient toujours conclu à la résistance de deux espèces *P. cerasus* et *P. avium*. Il est donc aujourd'hui de première importance de vérifier ces observations, d'évaluer les sources (souches de virus, vecteurs) d'infection de ces espèces, l'impact épidémiologique de ces infections et les risques nouveaux qui pourraient en résulter ■

Références

1. Atanassov D. Plum pox. A new virus disease. *Ann Univ Sofia, Fac Agric Silvicult* 1932 ; 11 : 49-69.
2. Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, et al. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA from a widely divergent strain (El Amar) of plum pox potyvirus. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 1741-6.
3. Acuna R. Outbreaks of plum pox virus in Chile. *Bull de l'EPPO* 1994 (in press).
4. Dunez J, Sutic D. Plum pox virus. In : Smith IM, Dunez J, Lelliot RA, Phillips DH, Archer SA, eds. *European Handbook of Plant Diseases*.

Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1988 : 44-6.

5. Sutic D, Jordovic M, Rankovic M, Festic H. Comparative studies of some sharka (plum pox) isolates. *Ann Phytopathologie* 1971 ; n° hors série : 184-92.
6. Kerlan C, Dunez J. Différenciation biologique et sérologique de souches de virus de la sharka. *Ann Phytopathologie* 1979 ; 11 : 241-50.
7. Lain S, Riechmann JL, Garcia JA. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res* 1989 ; 13 : 157-72.
8. Maiss E, Timpe U, Briske A, et al. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 513-24.
9. Teycheney PY, Tavert G, Delbos R, Ravelonandro M, Dunez J. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA strain D. *Nucl Acids Res* 1989 ; 17 : 10115-6.
10. Riechmann JL, Lain S, Garcia JA. Infectious *in vitro* transcripts from plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology* 1990 ; 177 : 710-6.
11. Maiss E, Timpe U, Briske-Rode A, Lese-mann DE, Casper R. Infectious *in vivo* transcripts of a plum pox potyvirus full-length cDNA clone containing the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 709-13.
12. Varveri C, Ravelonandro M, Dunez J. Construction and use of a cloned cDNA probe for the detection of plum pox virus in plants. *Phytopathol* 1987 ; 77 : 1221-4.
13. Varveri C, Candresse T, Cugisi M, Ravelonandro M, Dunez J. Use of a 32P labeled transcribed RNA probe for dot hybridization detection of plum pox virus. *Phytopathol* 1988 ; 78 : 1280-3.
14. Wetzel T, Tavert G, Teycheney PY, Ravelonandro M, Candresse T, Dunez J. Dot hybridization detection of plum pox virus using 32P labeled RNA probes representing non structural viral protein genes. *J Virol Meth* 1990 ; 30 : 161-72.
15. Regner F, da Camara Machado A, Laimer da Camara Machado M, et al. Coat protein mediated resistance to plum pox virus in *Nicotiana glauca* and *N. glauca*. *Plant Cell Reports* 1992 ; 11 : 30-3.
16. Ravelonandro M, Monsion M, Delbos R, Dunez J. Variable resistance to plum pox virus and potato virus Y infection in transgenic *Nicotiana glauca* plants expressing plum pox virus coat protein. *Plant Science* 1993 ; 91 : 157-69.
17. Laimer da Camara Machado M, da Camara Machado A, Hanzler V, et al. Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat gene of plum pox virus. *Plant Cell Reports* 1992 ; 11 : 25-9.
18. Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, et al. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein. *Plant Cell Reports* 1994 ; 14 : 18-22.
19. Wetzel T, Candresse T, Ravelonandro M, Dunez J. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *J Virol Methods* 1991 ; 33 : 355-65.
20. Cervera MT, Riechmann JL, Martin MT, Garcia JA. 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and O6 isolates : evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 329-34.
21. Kerlan C, Dunez J. Some properties of plum pox virus and its nucleic and protein components. *Acta Horticulturae* 1976 ; 67 : 189-92.

22. Ravelonandro M, Varveri C, Delbos R, Dunez J. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of the plum pox potyvirus. *J Gen Virol* 1988 ; 69 : 1509-16.
23. Palkovics L, Burgyan J, Balazs E. Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum pox virus strains. *Virus genes* 1993 ; 7 : 339-47.
24. Garcia JA, Riechmann JL, Lain S. Artificial cleavage site recognized by plum pox potyvirus protease in *Escherichia coli*. *J Virology* 1989 ; 63 : 2457-60.
25. Ravelonandro M, Peyruchaud O, Garrigue L, de Marcillac G, Dunez J. Immunodetection of the plum pox helper component in infected plants and expression of its gene in transgenic plants. *Arch Virology* 1993 ; 130 : 251-68.
26. Lain S, Riechmann JL, Garcia JA. RNA helicase : a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucl Acid Res* 1990 ; 18 : 7003-6.
27. Adamolle C. *Le virus de la sharka : obtention et caractérisation partielle d'anticorps polyclonaux spécifiques de protéines non structurales. Approche de la bio-écologie de deux sérotypes épidémiques en verger*. Thèse de Doctorat, Univ de Bordeaux II, 1993 : 46-76.
28. Nemeth M. Field and greenhouse experiments with plum pox virus. *Phytopathologia Mediterranea* 1963 ; 11 : 162-6.
29. Dunez J. Application des techniques immunoenzymatiques à la détection de certains virus pathogènes des végétaux. La méthode Elisa. *Ann Phytopathologie* 1977 ; 9 : 219-21.
30. Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox virus detection. *J Virol Methods* 1992 ; 39 : 27-37.
31. Audergon JM, Dosba F, Karayiannis I, Dicienta F. Amélioration de l'Abricotier pour la résistance à la sharka. *Bull de l'EPPO* 1994 ; 24 : 741-8.
32. Dosba F, Lansac M, Eyguard JP, Bonnet A, Salesses G. Behaviour towards PPV of *Prunus* interspecific hybrids and plums varieties. *Acta Horticulturae* 1994 (in press).
33. Syrgiannidis G. Selection of two apricot varieties resistant to sharka virus. *Acta Phytopathol Acad Scientiarum Hungariae* 1980 ; 15 : 85-8.
34. Powell Abel P, Nelson RS, De B, et al. Delay of development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 1986 ; 232 : 738-43.
35. Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE. Coat protein mediated resistance against virus infection. *Ann Rev Phytopathol* 1990 ; 28 : 451-74.
36. Ravelonandro M, Monsion M, Teycheney PY, Delbos R, Dunez J. Construction of a chimeric viral gene expressing plum pox virus coat protein. *Gene* 1992 ; 120 : 167-73.
37. Lecoq H, Ravelonandro M, Wipf-Scheibel, Monsion M, Raccach B, Dunez J. Aphid transmission of an aphid non-transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993 ; 6 : 403-6.

Résumé

La production de fruits à noyau est, dans le monde, gravement compromise ou menacée par une maladie appelée sharka dont l'agent causal est un virus du groupe des Potyvirus. En Europe, des centaines de millions d'arbres fruitiers à noyau sont infectés et leur production est souvent impropre à la commercialisation. La maladie a été identifiée il y a une soixantaine d'années en Bulgarie et s'est étendue progressivement à l'ensemble de l'Europe.

La sharka infecte les espèces Abricotier, Pêcher et Prunier. Des infections ont été récemment signalées sur Cerisier, mais il faut considérer de telles situations comme extrêmement ponctuelles. Les recherches à venir permettront de vérifier si réellement les espèces Cerisier (acide et doux) peuvent être hôtes du virus, affectées par la maladie, sources d'infection et si les souches infectant les espèces Cerisier sont différentes de celles connues sur les espèces Abricotier, Pêcher et Prunier.

Si elle sévit essentiellement en Europe, la sharka est également présente au Moyen-Orient et en Égypte et sa présence a été rapportée au Chili. Cette maladie est une très grave menace pour l'ensemble des zones fruitières du monde et les pays qui en sont exempts appliquent des contrôles rigoureux pour éviter son introduction.

Les efforts des pathologistes ont tout d'abord porté sur la cause de la maladie et sur sa diffusion. La connaissance de l'agent causal, son identification et sa dissémination naturelle ont permis la mise au point de techniques biologiques puis sérologiques pour la détection du virus.

Devant l'absence apparente de sources de résistance, les stratégies de lutte se sont longtemps limitées à l'éradication et,

là où celle-ci était inefficace, à la culture de variétés tolérantes qui présentent peu ou pas de symptômes. Les progrès réalisés au cours des quinze dernières années dans les différentes disciplines de la biologie, notamment en biologie moléculaire, ont fait apparaître de nouvelles approches pour entreprendre une lutte efficace contre ce virus. Des opportunités remarquables ont permis la synthèse artificielle de copies ADNc de l'ARN du génome viral et leur clonage dans un plasmide bactérien. Il a ainsi été possible de déterminer la structure primaire de l'ARN génomique viral. Ces copies ADNc ont aussi servi d'outils pour développer des techniques de diagnostic performantes telles que la mise au point de sondes moléculaires (ADN ou ARN), l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques et l'amplification génique (PCR). Avec le développement des techniques d'isolement, de manipulation et de transfert de gènes dans les plantes, il est devenu possible de créer des plantes transgéniques exprimant des séquences d'origine virale et capables de résister à une infection virale.

Dans la dernière décennie, quelques variétés résistantes au virus ont été détectées chez l'Abricotier et chez quelques espèces de *Prunus* sauvages, permettant d'envisager de disposer prochainement de variétés issues de croisements intra ou inter-spécifiques, ayant un bon niveau de résistance à la sharka.

Ces technologies doivent permettre de disposer d'un ensemble de stratégies de lutte destinées à limiter la diffusion du virus de la sharka dans les vergers et à réduire progressivement l'impact de la maladie.
