
La jaunisse nanisante de l'orge en Wallonie : Mise au point d'un test de détection et étude de la prévalence du BYDV-PAV dans les parcelles en agriculture biologique et dans les vols de pucerons

Auteur : Jacob, Martin

Promoteur(s) : 28783; Massart, Sébastien

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/24094>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**LA JAUNISSE NANISANTE DE L'ORGE EN WALLONIE :
MISE AU POINT D'UN TEST DE DÉTECTION ET ÉTUDE DE LA
PRÉVALENCE DU BYDV-PAV DANS LES PARCELLES EN
AGRICULTURE BIOLOGIQUE ET DANS LES VOLS DE
PUCERONS**

MARTIN JACOB

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

CO-PROMOTEURS : PROFESSEUR SÉBASTIEN MASSART, DOCTEUR PIERRE HELLIN

« Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech. »

« Le présent document n'engage que son auteur. » ;

**LA JAUNISSE NANISANTE DE L'ORGE EN WALLONIE :
MISE AU POINT D'UN TEST DE DÉTECTION ET ÉTUDE DE LA
PRÉVALENCE DU BYDV-PAV DANS LES PARCELLES EN
AGRICULTURE BIOLOGIQUE ET DANS LES VOLS DE
PUCERONS**

MARTIN JACOB

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

CO-PROMOTEURS : PROFESSEUR SÉBASTIEN MASSART, DOCTEUR PIERRE HELLIN

Encadrement du travail de fin d'études

Ce travail de fin d'études a été réalisé à Gembloux, au Centre Wallon de recherche agronomique (CRA-W) dans le département des sciences du vivant dans l'unité santé des plantes et forêts au sein du laboratoire de virologie.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail de fin d'études.

En particulier, j'aimerais remercier le docteur Pierre Hellin, mon co-promoteur, qui a su me guider et m'accompagner dans la réalisation de ce travail, en prenant toujours le temps pour répondre à mes questions ou pour m'éclairer dans mes démarches.

Je souhaite également remercier le professeur Sébastien Massart, mon co-promoteur, qui m'a donné des conseils et des commentaires pertinents tout au long du travail.

Je souhaite remercier l'équipe de Virologie du CRA-W de Gembloux, dont Stephen Steyer pour sa bienveillance et ses recommandations tout au long de mon travail de fin d'études, ainsi que Pauline Richet et Elisabeth Demonty pour leur assistance, leur professionnalisme et leurs rires. Merci en particulier pour la formation aux techniques de laboratoire, ainsi que pour les manipulations d'extractions que je n'ai pas pu faire quand j'avais le bras dans le plâtre.

Ensuite, j'aimerais remercier mes amis gembloutois, qui ont rendu ces années d'étude extrêmement sympathiques et inoubliables. Merci à Mazarine, Matthieu, Lilian, Valou et à toutes les personnes qui ne rentrent pas dans cette liste mais qui s'y reconnaîtront.

Enfin, j'aimerais remercier mes colocataires, qui m'ont aidé jusqu'au bout pour la réaction de mon TFE. Merci à Anaïs, Emma, Clément², Martin, Théo et Jérémy.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille pour la chance extraordinaire qu'ils m'offrent de pouvoir faire des études, et pour tout l'amour qu'ils me donnent.

Abstract

[FR] Ce travail de fin d'études a pour objectif d'évaluer la prévalence de la jaunisse nanisante (Yellow Dwarf Virus, YDVs), en se concentrant sur les espèces BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV, ainsi que de valider et vérifier une méthode de détection du virus dans les pucerons. L'étude a été menée en Wallonie, en analysant à la fois des échantillons d'orge et des pucerons vecteurs piégés.

Une double approche méthodologique a été utilisée pour cette recherche. La détection des YDVs dans les parcelles d'orge a été réalisée par des tests immuno-enzymatiques (DAS-ELISA). Parallèlement, une méthode moléculaire, la RT-qPCR, a été employée pour détecter la présence des virus dans les populations de pucerons en vol. La fiabilité de la RT-qPCR a été minutieusement vérifiée en analysant des paramètres clés comme sa sensibilité, sa spécificité (inclusive et exclusive), sa sélectivité, sa répétabilité et sa reproductibilité.

Les résultats des tests DAS-ELISA permettent de confirmer la présence de BYDV-PAV sur le territoire Wallon, et les résultats du test RT-qPCR sont prometteurs, démontrant une bonne sensibilité et une spécificité inclusive pour les virus ciblés, ainsi qu'une excellente répétabilité et reproductibilité. Cependant, il a été constaté que le test n'est pas limité à l'espèce BYDV-PAV, mais détecte également l'espèce BYDV-PAS. Ces travaux contribuent à l'amélioration de la surveillance et de la gestion intégrée des YDVs dans les cultures de céréales. Les données collectées constituent une base pour le développement d'outils d'aide à la décision, permettant d'optimiser le moment d'application des produits phytopharmaceutiques et, in fine, de réduire l'usage des pesticides.

[EN] The aim of this study is to assess the prevalence of yellow dwarf viruses (YDVs), focusing on the BYDV-PAV, BYDV-MAV, and CYDV-RPV species, as well as to validate and verify a method for detecting the virus in aphids. The study was conducted in Wallonia, analyzing both barley samples and trapped vector aphids. A dual methodological approach was used for this research. YDV detection in barley plots was performed using enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA). At the same time, a molecular method, RT-qPCR, was used to detect the presence of viruses in flying aphid populations. The reliability of RT-qPCR was thoroughly verified by analyzing key parameters such as its sensitivity, specificity (inclusive and exclusive), selectivity, repeatability, and reproducibility.

The results of the RT-qPCR analyses are promising, demonstrating good sensitivity and inclusive specificity for the target viruses, as well as excellent repeatability and reproducibility. However, it has been found that the test is not limited to the BYDV-PAV species, but also detects the BYDV-PAS species. This work contributes to improving the monitoring and integrated management of YDVs in cereal crops. The data collected provides a solid basis for the development of decision-making tools, enabling the timing of plant protection product application to be optimized and, ultimately, reducing pesticide use.

Table des matières

1. Introduction	10
1.1. Virus de la jaunisse nanisante.....	10
1.1.2 Les agents pathogènes	10
1.1.3. Symptômes	12
1.1.4. Importance économique.....	13
1.1.5. Plantes hôtes.....	13
1.1.6. Vecteurs.....	13
1.1.7. Distribution Géographique	15
1.1.8. Épidémiologie	16
1.1.9. Méthodes de lutte	17
1.2. Méthode de détection YDV	19
1.2.1. ELISA dans la détection du YDV dans les champs	19
1.2.3. Validation et vérification du test RT-qPCR	20
1.3. Développement de systèmes d'avertissement	21
1.4. Objectif de l'étude.....	21
2. Matériel et Méthodes	23
2.1. Echantillonnage	23
2.1.1. Plants d'orge	23
2.1.2. Pucerons	24
2.2. Extractions.....	26
2.2.1. Préparation de l'échantillon pour l'ELISA	26
2.2.2. Broyage d'échantillons des pucerons et de plantes	26
2.2.3. Témoins positifs plante	26
2.3. Tests DAS-ELISA pour détection de BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV dans les champs d'orge.....	27
2.3.1. Coating.....	27
2.3.2. Procédure de lavage	28
2.3.3. Antigène	28
2.3.4. Conjugué.....	28
2.3.5. Substrat	28
2.3.6. Lecture des plaques ELISA et interprétation des résultats	28
2.3.7. Analyse de la sensibilité du test DAS-ELISA.....	29
2.4. Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) pour la détection de l'ARN du virus BYDV-PAV dans les pucerons	29
2.4.1. Test de détermination du meilleur ratio sonde et amorces.....	29

2.4.2. Protocole RT-qPCR	29
2.5. Tests d'optimisation de l'analyse de BYDV-PAV dans les pucerons	33
2.5.1. Méthode de conservation des pucerons	33
2.5.2. Contamination croisée.....	33
2.6. Analyse statistique, traitement des données et test ANOVA.....	34
3. Résultats.....	35
3.1. Test ELISA en BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV.....	35
3.1.1. Sensibilité du test DAS-ELISA	35
3.1.2. Prévalence en parcelle d'orge de BYDV-PAV	35
3.1.3. Prévalence BYDV-MAV et CYDV-RPV	37
3.2. Validation et vérification du test RTqPCR.....	38
3.2.1. Concentration sonde et amorces pour la RT-qPCR.....	38
3.2.2. Evaluation de la sensibilité analytique	39
3.2.3. Spécificité analytique.....	41
3.2.4. Sélectivité.....	47
3.2.5. Répétabilité	48
3.2.6. Reproductibilité	49
3.3. Tests d'optimisation de l'analyse RT-qPCR.....	50
3.3.1. Test méthode de conservation	50
3.3.2. Test contamination croisée	51
3.4. RT-qPCR pucerons Automne 2024	51
4. Discussion	53
4.1. Évaluation des méthodes de détection des virus	53
4.1.1. DAS-ELISA : Avantages et limites	53
4.1.2. RT-qPCR : performances et spécificité.....	53
4.2. Prévalences et implications épidémiologiques	55
4.2.1. Prévalence des YDVs dans les parcelles Wallonnes	55
4.2.2. Prévalence des pucerons piégés	55
4.2.3. Prévalence pucerons positifs au BYDV.....	55
4.3. Limites de l'étude et perspectives futures	56
4.3.1. Echantillonnage, méthodes de détection et ensemble de données.....	56
5. Conclusion.....	57
6. Contributions personnelles de l'étudiant.....	57
7. Annexes	58
8. Bibliographie	60

1. Introduction

1.1. Virus de la jaunisse nanisante

Les maladies virales représentent une menace constante et significative pour la production agricole mondiale, causant des pertes de rendement considérables pouvant entraîner des impacts économiques majeurs. Les virus de la jaunisse nanisante (Yellow Dwarf Virus - YDV), sont responsables des maladies virales les plus importantes et répandues affectant les céréales à paille à l'échelle mondiale (D'Arcy et al., 1995). Les pertes de rendement qu'ils engendrent ont un impact significatif sur la production céréalière mondiale, menaçant la sécurité alimentaire et la viabilité économique des exploitations agricoles.

Le terme générique "Yellow Dwarf Virus" (YDV) englobe un groupe polyphylétique de virus à ARN monocaténaire à polarité positive, non enveloppés. Parmi ceux-ci, on note les barley yellow dwarf viruses (BYDV) du genre *Luteovirus*, qui sont classés dans la famille des *Tombusviridae* (Scheets et al., 2020), et les cereal yellow dwarf viruses (CYDV) du genre *Polerovirus* qui font partie de la famille des *Solemoviridae* (Sömera et al., 2021),

Il existe plusieurs espèces de YDV (anciennement nommées « sérotypes », sur base de la classification antigénique de ces virus) au sein d'un même genre. Ces virus sont exclusivement propagés de plante en plante par différentes espèces de pucerons vecteurs.

1.1.2 Les agents pathogènes

L'émergence du terme BYDV dans la littérature scientifique remonte au milieu du 20ème siècle, suite à une épidémie dévastatrice affectant les champs d'orge et d'avoine en Californie (Oswald et Houston, 1953 ; D'Arcy et al., 1995). Initialement, la classification de ces virus reposait principalement sur leurs phénotypes de transmission par les pucerons (D'Arcy et al., 1995). Cependant, l'avènement des analyses moléculaires a révolutionné cette taxonomie, permettant une classification plus précise basée sur des critères génétiques (Miller et al., 2002).

La classification officielle des virus des espèces de YDV est gérée et mise à jour par l'ICTV (2025). Les familles *Tombusviridae* et *Solemoviridae* appartiennent au même Règne (*Orthonavirae*) mais à des phylums différents (*Kitrinoviricota* et *Pisuviricota* respectivement). L'arbre phylogénétique (Figure 1) reprend la taxonomie des virus d'intérêt pour cette étude.

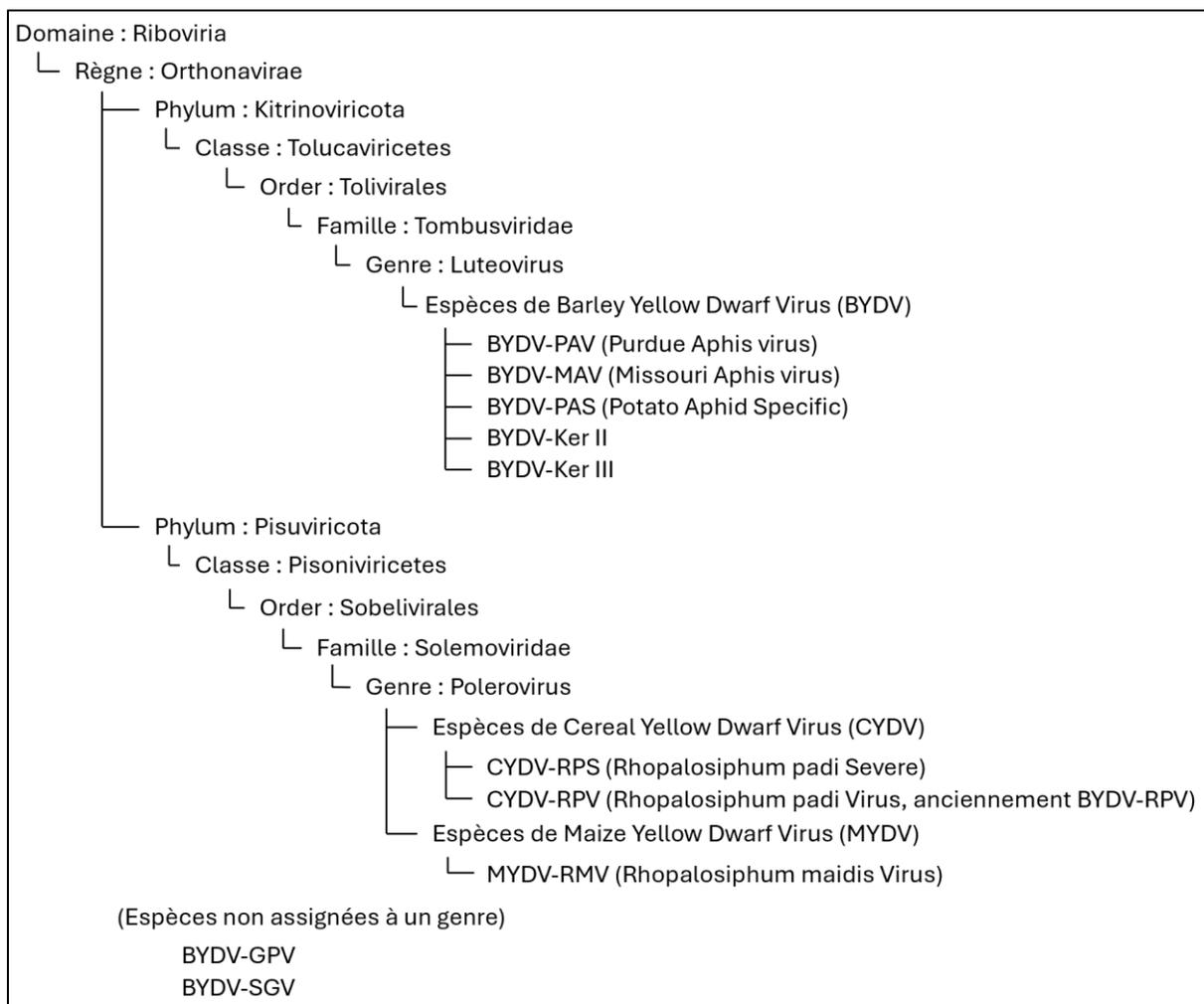


Fig 1 : Classification hiérarchique des espèces principales de YDV, allant du domaine jusqu'à l'espèce

Genre *Luteovirus*

Ce genre inclut les espèces classiques du Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV). *Luteovirus pavhordei* (BYDV-PAV) est souvent considéré comme l'espèce la plus répandue et la plus étudiée au niveau mondial (Miller et Rasochova, 1997). D'autres espèces importantes comprennent *Luteovirus mavhordei* (BYDV-MAV), *Luteovirus pashordei* (BYDV-PAS) (récemment distingué du BYDV-PAV), *Luteovirus kerbihordei* (BYDV-KerII) et *Luteovirus kertrihordei* (BYDV-KerIII).

Certaines espèces ont été récemment découvertes par des chercheurs mais non encore reconnues par l'ICTV, comme le BYDV-BEL, détecté dans la plante hôte *Poa trivialis* (NCBI Genome, 2025) et le Oat Yellow Dwarf Virus (BYDV-OYV) (Sõmera et al., 2021).

Genre *Polerovirus*

Ce genre regroupe les espèces du Cereal Yellow Dwarf Virus (CYDV) et du Maize Yellow Dwarf Virus (MYDV). L'espèce la plus notable de ce genre est le CYDV-RPV mais il existe également une variante plus sévère, le CYDV-RPS, et le MYDV-RMV.

Espèces non assignées à un genre

Certaines espèces de BYDV, telles que BYDV-GPV et BYDV-SGV, ne sont pas encore formellement assignées à un genre au sein de la famille des Solemoviridae ou

Tombusviridae (Walls III et al., 2019). Cette absence d'assignation générique pour ces espèces découle de leur profonde divergence phylogénétique par rapport aux genres *Luteovirus* et *Polerovirus*.

1.1.3. Symptômes

Les plantes infectées par les YDV présentent divers symptômes résultant de la perturbation physiologique causée par le virus, principalement via la dégénérescence du phloème et l'altération du transport des photosynthétats (D'Arcy et al., 1995). Parmi les symptômes visuels les plus courants, on observe une décoloration des feuilles, allant de la chlorose à l'anthocyanose, un nanisme marqué des plantes, une réduction du nombre de talles, une diminution du nombre de grains par épi (Hoffman et Kolb, 1998), une baisse du poids des grains et un développement racinaire amoindri. Des symptômes tels que la chlorose et une réduction de la hauteur des plantes peuvent également être observés (Miller et Rasochova, 1997).

La sévérité et l'expression phénotypique de ces symptômes peuvent varier significativement en fonction de plusieurs facteurs, comme le stade de croissance de la plante au moment de l'infection (l'infection des jeunes plantes étant la plus dommageable), l'espèce et la variété de la plante hôte et les conditions environnementales (température, luminosité, ou stress abiotiques) (Bisnieks et al., 2006).

L'expression des symptômes est également influencée par la spécificité de l'espèce infectant la plante. Le BYDV-PAV est fréquemment associé à des jaunissements et des rougissements marqués, tandis que le BYDV-MAV tend à induire des symptômes souvent plus modérés ou tardifs. Le CYDV-RPV est quant à lui plus souvent caractérisé par un jaunissement pur avec un nanisme moins prononcé. Des études récentes ont cependant mis en évidence que des espèces comme le BYDV-PAS et des variantes telles que le CYDV-RPS peuvent induire des symptômes particulièrement sévères, parfois plus intenses que ceux observés avec le BYDV-PAV (Walls III et al., 2019).

Enfin, les infections mixtes de YDV dans les plantes hôtes peuvent entraîner des symptômes d'autant plus sévères (Choudhury et al., 2017; Malmstrom et al., 2017; Minato et al., 2022), et les infections mixtes avec des espèces en dehors des YDV peuvent modifier les caractéristiques des interactions entre l'hôte, le virus et le vecteur, comme par exemple les interactions entre le BYDV-PAV et le virus du nanisme du blé (WDV) (Armand et al., 2023).



Figure 2. Symptômes du YDV. A: Un champ d'une variété sensible (photo prise le 26/03/25). B: Symptômes sur une plante (photo prise le 03/04/25)

1.1.4. Importance économique

L'ampleur des pertes de rendement occasionnées par les YDV est multifactorielle, variant considérablement en fonction du contexte épidémiologique, incluant notamment l'espèce et la variété de la plante hôte, l'espèce de YDV impliquée et les conditions environnementales (Miller et Rasochova, 1997). Ces pertes peuvent être substantielles. Il existe une relation linéaire entre l'incidence du virus et la perte de rendement, allant de 13 à 25 kg/ha et 44 à 55 kg/ha pour le blé et l'avoine respectivement, pour chaque augmentation de 1 % de l'incidence du virus, et ces pertes peuvent atteindre 2700 kg/ha (McKirdy et Jones, 2002). Plus spécifiquement, dans une étude menée dans le sud-est de l'Australie, les pertes de rendement consécutives à une infection par le BYDV-PAV se sont élevées à 84 % pour le blé et 64 % pour l'orge, soulignant le potentiel dévastateur de cet agent pathogène (Nancarrow et al., 2021).

1.1.5. Plantes hôtes

La gamme d'hôtes des YDV est remarquablement large, bien que strictement limitée aux espèces appartenant à la famille des *Poaceae* (graminées). Cette spécificité fait des céréales et des graminées les principales cibles de ces pathogènes (D'Arcy et al., 1995). Plus de 150 espèces différentes de *Poaceae* peuvent être infectées, parmi lesquelles figurent les cultures céréalières d'importance majeure telles que l'orge, le blé, l'avoine, le maïs, le riz, le seigle et le triticale (D'Arcy et al., 1995).

Au-delà des cultures, les graminées sauvages et les prairies permanentes jouent un rôle crucial en tant que réservoirs viraux naturels pour les YDV (Ingwell et Bosque-Pérez, 2015). Ces populations végétales non cultivées peuvent héberger les virus de manière asymptomatique ou avec des symptômes atténués, servant ainsi de source d'inoculum pour les pucerons vecteurs.

1.1.6. Vecteurs

La dissémination des YDV dépend entièrement de leur mode de transmission obligatoire par des insectes vecteurs, principalement des espèces de pucerons (*Aphididae*). Le virus

se multiplie dans le phloème des plantes infectées, sa transmission est caractérisée comme persistante, circulatoire et non propagative (Sylvester, 1980). Une transmission persistante signifie que le vecteur peut transmettre le virus indéfiniment lors de sa vie, sans avoir à acquérir davantage de virus d'une plante infectieuse. Pour une transmission circulatoire, le virus s'accumule dans l'intestin du puceron lorsqu'il se nourrit de la sève d'une plante infectée puis certaines particules virales sont activement transportées dans l'hémocèle, jusqu'à être activement transportées jusqu'au système salivaire. Enfin, non-propagative signifie que le virus ne se multiplie pas dans le puceron.

En climat tempéré, comme en Belgique, plusieurs espèces de pucerons sont reconnues comme des vecteurs majeurs des YDVs. Parmi celles-ci, on compte *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae*, *Metopolophium dirhodum*, *Rhopalosiphum maidis* et *Rhopalosiphum insertum*. Leur abondance, leurs cycles de vie (incluant des phases ailées et aptères), et leur migration entre les graminées sauvages et les cultures céréalières sont des facteurs déterminants dans l'épidémiologie de ces maladies. Les pucerons ailés, notamment, jouent un rôle crucial dans la dissémination à longue distance des virus au début de l'automne, colonisant les jeunes plantules de céréales d'hiver (Van den Eynde et al., 2020). La température est un facteur environnemental clé influençant à la fois l'activité des pucerons et le cycle de vie du virus dans la plante (Fabre et al., 2005). Certaines espèces présentent une efficacité de transmission plus élevée pour des espèces de YDV spécifiques (Tableau 1).

Espèces	Genres	<i>Luteovirus</i>				<i>Polerovirus</i>			Non-assignées	
		PAV	MAV	PAS	KerII	RPV	RPS	RMV	GPV	SGV
<i>Rhopalosiphum padi</i>		+++	-	O	O	+++	O	+	++	-
<i>Sitobion avenae</i>		++	+++	O		-		-	+	-
<i>Metopolophium dirhodum</i>		++	+++	O		-				
<i>Rhopalosiphum maidis</i>		-	-	O		-		+++		-

+++, l'espèce vectrice transmet l'espèce de BYDV de manière très efficace et constitue le principal vecteur (75-100%); ++, transmet l'espèce de BYDV efficacement mais n'est pas le principal vecteur (25-75%); +, ne transmet pas l'espèce de BYDV de manière très efficace, mais plus que rarement (5-25%); -, ne transmet pas, ou transmet rarement l'espèce de BYDV (0-5%). O, l'espèce est connue pour transmettre l'espèce de BYDV, mais aucune information sur l'efficacité de la transmission n'est disponible. Les cellules vides indiquent qu'il n'y a pas d'information sur la transmission de ce vecteur et de cette espèce de BYDV. L'espèce *Luteovirus KerIII* n'a pas été incluse dans le tableau car aucune information n'est disponible sur l'espèce vectrice.

Tableau 1 : Efficacité de la transmission des espèces de pucerons du BYDV-PAV. Adapté de Van den Eynde et al. (2020).

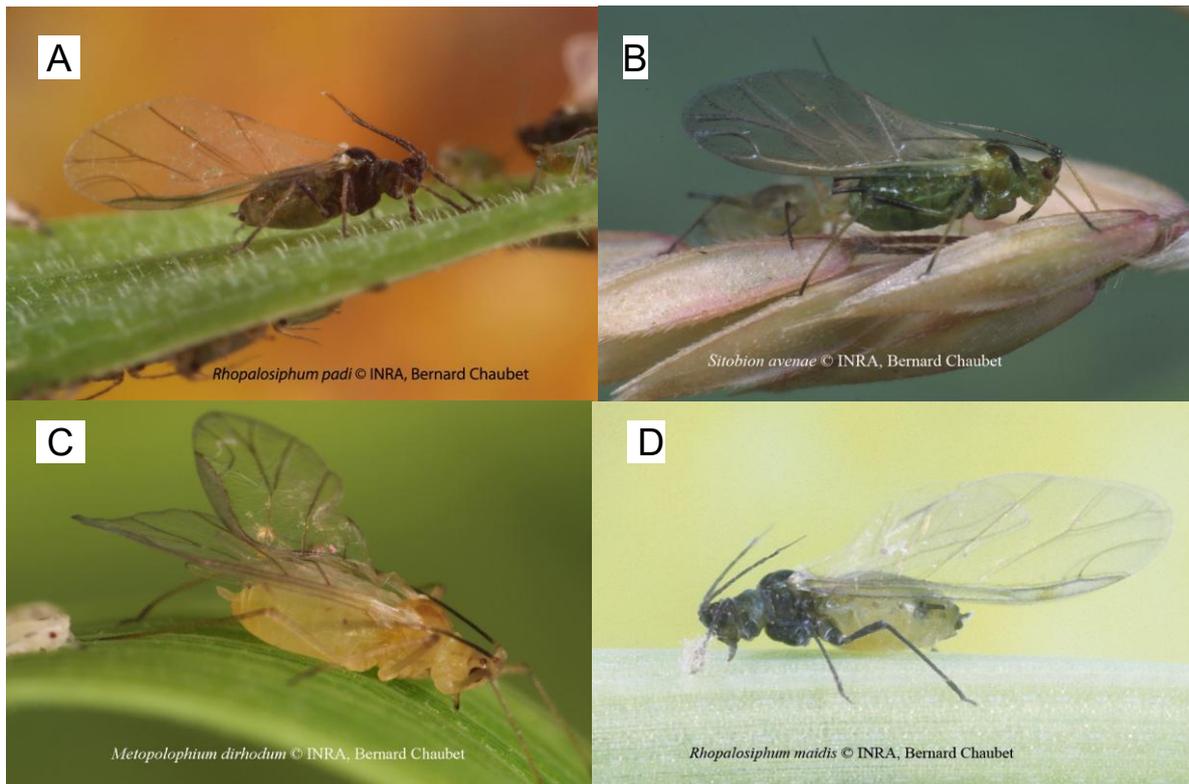


Fig 3: (A) *R. padi*, (B) *S. avenae*, (C) *M. dirhodum* et (D) *R. maidis*. Photos issues de l'INRA, © Bernard Chaubet (<https://encyclopedie-pucerons.hub.inrae.fr/fiche-especes/pucerons> consulté le 12/08/25)

1.1.7. Distribution Géographique

Les virus de la jaunisse nanisante ont une distribution quasi-mondiale, reflétant l'omniprésence de leurs hôtes céréaliers et de leurs vecteurs pucerons dans la plupart des régions agricoles (D'Arcy et al., 1995). Leur propagation est intrinsèquement liée aux mouvements des pucerons vecteurs et aux échanges de matériel végétal infecté, permettant aux virus de s'établir dans de nouvelles zones géographiques favorables à la culture des *Poaceae*. Les régions tempérées, subtropicales et même certaines zones tropicales sont affectées, faisant des YDV l'une des maladies virales les plus répandues sur les céréales (Miller et Rasochova, 1997).

La prévalence et l'incidence des différentes espèces de YDV varient considérablement à l'échelle mondiale, étant fortement influencées par les espèces de vecteurs dominantes, leurs spécificités de transmission, et les conditions environnementales et agricoles locales. Par exemple, bien que le BYDV-PAV soit souvent considéré comme l'espèce la plus répandue et dommageable à l'échelle mondiale en raison de l'efficacité de ses vecteurs comme *R. padi* et *S. avenae*, des études régionales révèlent des prédominances différentes : en Irlande, le BYDV-MAV est l'espèce la plus dominante, ce qui pourrait être lié à l'abondance de *S. avenae* et à de faibles niveaux de culture de maïs dans le paysage (Byrne et al., 2024). En République tchèque, le BYDV-PAS est l'espèce la plus fréquemment détectée, malgré le fait que le BYDV-PAV provoque des symptômes plus graves (Jarosova et al., 2013). Cette variabilité est également visible au Royaume-Uni, où les souches sévères de BYDV sont plus fréquentes dans le sud et l'ouest en raison de la présence plus importante de *R. padi*, un vecteur efficace des souches virulentes (Plumb, 1974). Ces dynamiques complexes sont également modelées par des facteurs

climatiques comme les hivers doux favorisant la survie anholocyclique des pucerons ou la présence d'hôtes estivaux comme le maïs et les prairies, qui servent de réservoirs viraux et de ponts entre les saisons de culture, influençant ainsi la proportion de pucerons virulifères et le risque épidémique (Irwin et al., 1990).

En Belgique, et plus particulièrement en Wallonie, les virus de la jaunisse nanisante représentent une préoccupation phytosanitaire majeure pour les cultures de céréales à paille, notamment l'orge et le blé. La présence des principales espèces de YDV dont le BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV, est avérée et leur présence est régulièrement observée dans les champs et prairies (Van den Eynde et al., 2020 ; Maclot et al., 2023). Les conditions climatiques tempérées de la Belgique sont propices au développement des populations de pucerons vecteurs et à la transmission automnale et printanière des virus. La diversité des paysages agricoles wallons, combinant cultures céréalières et prairies permanentes (servant de réservoirs viraux potentiels), favorise également la persistance des YDV dans l'environnement.

1.1.8. Épidémiologie

L'épidémiologie des YDV est étroitement liée au cycle de vie de leurs pucerons vecteurs et à la présence continue de plantes hôtes, un aspect crucial pour la gestion de la maladie en climats tempérés tels que la Belgique.

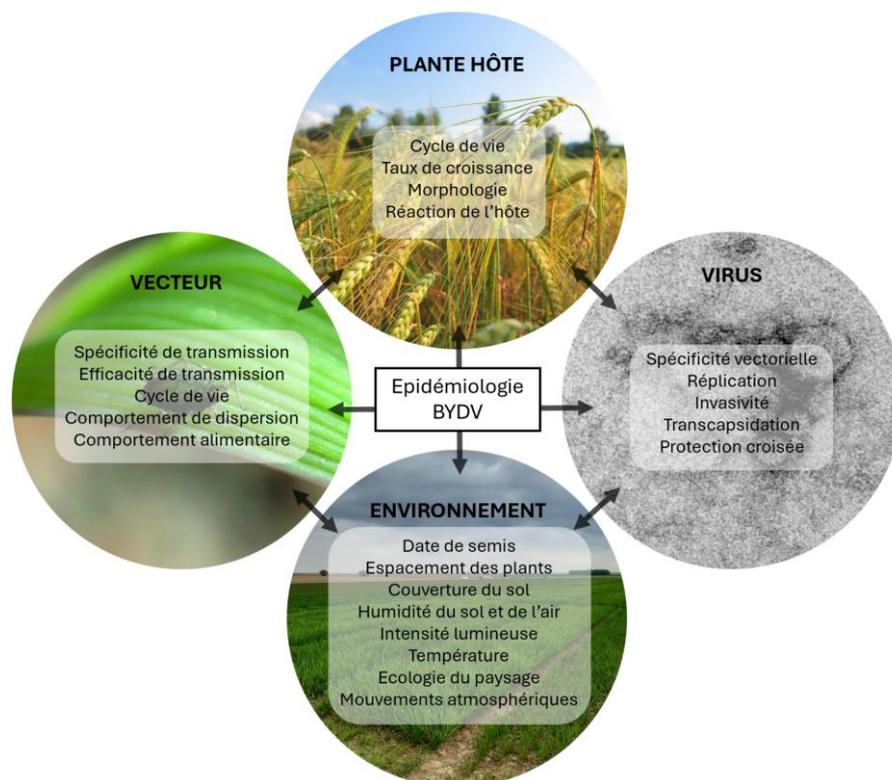


Fig 4: Facteurs influençant le développement des YDVs en lien avec la plante hôte, le vecteur, le virus et l'environnement. Adapté de D'Arcy et al (1995).

Les YDVs ne sont pas transmis par la graine ou le pollen, et leur survie hivernale ainsi que celle de leurs vecteurs repose sur plusieurs mécanismes. Les pucerons vecteurs peuvent hiverner sous forme d'œufs sexués déposés sur des hôtes primaires ligneux (ex: *Prunus*

padus pour *Rhopalosiphum padi*), ces œufs éclosant au printemps (Bisnieks et al., 2006). Alternativement, dans les régions aux hivers doux ou dans des microclimats protégés (prairies, bords de champs, repousses de céréales), certaines populations de pucerons peuvent survivre sous forme de nymphes ou d'adultes grâce à la reproduction parthénogénétique continue (Van den Eynde et al., 2020). Durant cette période, le virus persiste principalement dans les plantes hôtes pérennes, telles que les graminées sauvages et les prairies permanentes (Ingwell et Bosque-Pérez, 2015). Les repousses de céréales et les cultures de maïs constituent également des "ponts verts" essentiels, hébergeant pucerons et virus d'une culture de céréale à l'autre, les pucerons actifs pouvant maintenir le virus pendant plusieurs mois (Fabre et al., 2005 ; Gilabert et al., 2016).

Au printemps, l'augmentation des températures déclenche l'éclosion des œufs et la multiplication des populations hivernantes. Les pucerons ailés produits lors de vols de dispersion colonisent alors les jeunes céréales de printemps et d'autres graminées, initiant les infections virales de la nouvelle saison.

L'automne représente une période critique pour les cultures de céréales d'hiver. Des vols massifs de pucerons ailés, souvent virulifères après s'être nourris sur des plantes infectées (repousses, graminées sauvages ou céréales d'été mures), colonisent activement les jeunes semis (Van den Eynde et al., 2020). L'infection précoce des jeunes plantules est la plus préjudiciable, entraînant des symptômes plus sévères et des pertes de rendement maximales (Byrne et al., 2024). Le risque d'infection précoce et l'ampleur des dégâts sont accrus par une implantation précoce des céréales d'hiver et des températures automnales douces.

1.1.9. Méthodes de lutte

La gestion efficace des YDV repose sur une combinaison de stratégies visant à réduire l'incidence du virus et à minimiser ses effets sur le rendement (Walls III et al., 2019). Ces méthodes s'inscrivent de plus en plus dans une approche de lutte intégrée, combinant différentes approches pour une gestion durable.

Historiquement, la gestion des populations de pucerons vecteurs a largement reposé sur l'utilisation d'insecticides. Suite aux préoccupations relatives aux impacts sur les insectes pollinisateurs, l'Union Européenne a progressivement interdit l'utilisation des néonicotinoïdes pour le traitement de semences de la plupart des cultures céréalières. Cette interdiction a été formalisée par plusieurs textes législatifs, notamment le règlement d'exécution (UE) n° 2018/783 de la Commission et le règlement d'exécution (UE) n° 2018/785 de la Commission, qui ont étendu les restrictions initialement prévues par le règlement (UE) n° 485/2013. Cette position a été réaffirmée par la Cour de Justice de l'Union européenne qui, dans son arrêt du 19 janvier 2023, a précisé que les États membres ne pouvaient pas autoriser de dérogations d'urgence pour l'utilisation de semences traitées avec ces substances (CJUE, 2023). La lutte chimique repose désormais principalement sur des pulvérisations foliaires ciblées d'insecticides. Toutefois, cette lutte chimique rencontre des limites en termes de développement de résistances chez les vecteurs, notamment la résistance aux pyréthrianoïdes chez le puceron des céréales (*S. avenae*) (Mc Namara et al., 2024). En Belgique, les substances actives agréées pour le contrôle des pucerons sur l'orge d'hiver appartiennent

notamment aux familles des pyréthrinoïdes, des carbamates ou des pyridines carboxylates. Ces traitements sont souvent appliqués en fonction des seuils d'alerte et des observations de populations de pucerons afin de limiter le nombre d'applications.

Parallèlement à la lutte chimique, les pratiques culturales jouent un rôle essentiel. L'ajustement des dates de semis est une stratégie clé, visant à éviter les périodes de forte activité migratoire des pucerons vecteurs à l'automne, réduisant ainsi l'exposition des jeunes plantules aux infections primaires (Van den Eynde et al., 2020). Cependant, cette méthode de lutte devient de moins en moins efficace avec le réchauffement climatique, qui prolonge les périodes d'activité des pucerons en automne et en hiver (via une meilleure survie et une activité plus précoce), ainsi qu'en augmentant leur capacité à transmettre les virus (Ryalls et Harrington, 2017).

La destruction des "ponts-verts" peut également contribuer à limiter les réservoirs d'inoculum et de pucerons entre les cultures (Gilabert et al., 2016).

L'utilisation de variétés résistantes ou tolérantes aux YDVs constitue une approche agronomique particulièrement importante et durable (Van den Eynde et al., 2020). La résistance est définie comme la capacité de l'hôte à réduire la réplication virale. La tolérance est la capacité de l'hôte à présenter peu de symptômes même en présence d'une concentration virale élevée.

Des gènes de tolérance bien caractérisés incluent Ryd1, Ryd2, Ryd3, et Ryd4Hb. Le premier gène de tolérance reconnu est l'allèle récessif Ryd1, identifié dans le cultivar d'orge Rojo (Suneso, 1955 ; Jarosova et al., 2016), qui est responsable d'une tolérance moyenne au BYDV. Les gènes Ryd2 et Ryd3 ont été découverts grâce à un criblage approfondi des variétés locales d'orge éthiopiennes (Schaller et al., 1964 ; Niks et al., 2004). Enfin, « le gène Ryd4Hb introgressé de *Hordeum bulbosum* dans l'orge commune (*Hordeum vulgare*) confère une résistance complète et dominante au BYDV » (Scholz et al., 2009 ; Pidon et al., 2024). Il a également été démontré que le pyramidage (technique de sélection génétique qui consiste à combiner plusieurs gènes de résistance différents dans une seule et même variété) de Ryd2 et Ryd3 montre une résistance efficace plutôt qu'une simple tolérance (Riedel et al., 2011).

La tolérance et la résistance sont deux stratégies complémentaires : tandis que la résistance vise à bloquer le virus, la tolérance permet à la plante de mieux supporter l'infection en minimisant ses impacts sur la productivité (Walls III et al., 2019). Toutefois, la tolérance d'une plante à l'infection virale, en permettant la réplication du virus sans symptômes sévères, peut la transformer en un réservoir potentiel pour les espèces de YDVs.

Enfin, une gestion du paysage agricole à plus grande échelle est de plus en plus considérée dans les stratégies de lutte intégrée (Van den Eynde et al., 2020). En tenant compte du rôle des hôtes alternatifs (graminées sauvages, prairies) et des habitats semi-naturels sur les populations de pucerons et l'épidémiologie du virus, il est possible de développer des approches plus holistiques pour réguler les vecteurs et limiter la propagation des YDV. Par exemple, la gestion des repousses de céréales et des graminées adventices avant le semis est une stratégie clé pour rompre le "pont vert", ce qui réduit la source d'inoculum viral et limite l'exposition des jeunes plantules aux pucerons virulifères (ARVALIS, 2019).

1.2. Méthode de détection YDV

1.2.1. ELISA dans la détection du YDV dans les champs

La technique la plus couramment utilisée en virologie végétale pour la détection des YDV est le DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) pour la détection d'un grand nombre d'échantillons (French, 1995). La méthode DAS-ELISA, introduite par Voller et al. (1978), a été améliorée pour une utilisation dans les tests de routine (Clark et Adams., 1977).

Cette méthode immunologique repose sur la reconnaissance spécifique d'un antigène viral par des anticorps. Les puits d'une plaque de microtitration sont d'abord recouverts d'anticorps de capture (coating antibodies) spécifiques au virus recherché. Un échantillon végétal broyé est ensuite ajouté. Si le virus est présent, il se lie spécifiquement aux anticorps de capture fixés au fond du puits.

Après rinçage, des anticorps de détection, également spécifiques du virus et souvent couplés à une enzyme, sont ajoutés. Ces anticorps se lient au virus déjà immobilisé, formant un "sandwich" anticorps-antigène-anticorps.

Enfin, un substrat incolore spécifique à l'enzyme est ajouté. La réaction enzymatique catalyse la transformation du substrat en un produit coloré. L'intensité de la couleur développée est directement proportionnelle à la quantité de virus présente dans l'échantillon, et est mesurée par spectrophotométrie.

L'ELISA se positionne en tête des méthodes d'analyse de routine des YDV dans les plantes en raison de plusieurs avantages, notamment une bonne robustesse et un faible coût d'application. Cette méthode est également suffisamment sensible pour détecter le virus même en faibles quantités et dispose d'une bonne reproductibilité et répétabilité (Lister et Rochow, 1979).

Cependant, la méthode présente aussi quelques inconvénients. Sa sensibilité est généralement inférieure à celle des méthodes moléculaires basées sur la PCR ou la RT-qPCR, avec une limite de détection d'environ un million de particules virales par échantillon, seuil qui peut entraîner des faux négatifs (Canning et al., 1996).

De plus, l'ELISA nécessite la disponibilité d'anticorps spécifiques pour chaque virus ou sérotype d'intérêt (Voller et al., 1978). En raison de son manque de spécificité, la méthode DAS-ELISA ne permet pas une discrimination fiable entre plusieurs espèces de virus, notamment le BYDV-PAV et le BYDV-PAS. (Jarosova et al., 2013).

1.2.2. RT-qPCR dans la détection de YDV dans les pucerons

La *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) s'est imposée comme une méthode de diagnostic avancée, offrant une sensibilité et une spécificité accrues pour la détection des YDVs, particulièrement dans les insectes vecteurs comme les pucerons (Borgolte et al., 2024). L'analyse des virus dans les pucerons se fait ainsi fréquemment par RT-qPCR. Cette méthode d'analyse fonctionne également pour les plantes (Balaji et al., 2003).

Le processus de détection des YDVs par RT-qPCR dans les pucerons débute par l'extraction de l'ARN total de l'insecte (Fabre et al., 2003). L'ARN viral est ensuite rétrotranscrit en ADN qui sert alors de matrice pour la réaction de qPCR, où des amorces

et sonde spécifiques ciblent des régions conservées du génome viral, telles que le gène de la protéine de capsid (coat protein gene) du BYDV-PAV (Nagy et al., 2006). L'amplification est faite par une succession de cycles de dénaturation (l'ADN est chauffé à 95°C pour séparer les deux brins) et d'hybridation (également appelé *annealing*, où la température est abaissée entre 50 et 65°C pour permettre aux amorces sens et anti-sens de s'apparier à leurs séquences complémentaires sur leur brins respectifs).

Cette amplification est suivie en temps réel par la mesure de la fluorescence émise à chaque cycle de PCR, soit par des sondes fluorogéniques comme les sondes TaqMan® (Heid et al., 1996) soit par les colorants intercalants à l'ADN (Kubista et al., 2006). Le point où la fluorescence atteint un seuil détectable, appelé cycle seuil (*Cycle threshold* (Ct) en anglais), est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ARN viral dans l'échantillon, permettant une quantification précise et relative de la charge virale.

La RT-qPCR a l'avantage d'être plus sensible que l'ELISA, en détectant 10^2 copies d'ARN de BYDV-PAV, ce qui la rend 1000 fois plus sensible que l'ELISA et 10 à 100 fois plus sensible que la RT-PCR standard (Fabre et al., 2003). Pour la détection du BYDV-PAV dans les plantes de céréales, la RT-qPCR nécessitait seulement 2 à 12 heures post inoculation pour pouvoir amplifier le virus (Balaji et al., 2003).

Cette méthode de détection est hautement spécifique grâce à la conception d'amorces et de sondes qui ciblent des séquences virales spécifiques, permettant de distinguer précisément différentes espèces de YDVs (Deb et Anderson, 2008). Le fait de ne pas nécessiter de manipulations après l'amplification, comme l'analyse sur gel d'agarose, rend le protocole moins sujet aux contaminations croisées. Cette caractéristique est un avantage majeur pour l'automatisation et l'analyse à haut débit (Heid et al., 1996). Enfin, la RT-qPCR offre une quantification reproductible et précise de la charge virale, ce qui est crucial pour étudier la dynamique de la réplication virale et les mécanismes de résistance des plantes (Kubista et al., 2006). Cette méthode d'analyse peut être plus onéreuse que l'ELISA en raison du coût des réactifs (sondes, enzymes) et des équipements nécessaires (thermocycleur en temps réel).

La sensibilité et la spécificité de la RT-qPCR dépendent directement de la conception des amorces et des sondes (oligonucléotides). Une normalisation rigoureuse des données à l'aide de gènes de référence stables est nécessaire pour une quantification précise de la sensibilité analytique de cette méthode, afin de s'assurer de son inclusivité pour les virus recherchés et de son exclusivité pour les virus non ciblés (Hendling et Barisic, 2019).

1.2.3. Validation et vérification du test RT-qPCR

Pour garantir la fiabilité et la comparabilité des résultats en diagnostic phytosanitaire, l'établissement de méthodes standardisées et validées est primordial. L'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) a développé des lignes directrices, notamment la méthodologie PM 7/98 (5) "Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity" (2021). Cette norme définit un cadre rigoureux pour l'accréditation des laboratoires de diagnostic des bioagresseurs de cultures. Elle stipule que l'évaluation et la validation d'un test diagnostique doivent obligatoirement inclure l'analyse de multiples critères de performance essentiels : la sensibilité, la spécificité, la sélectivité, la répétabilité et la reproductibilité.

La sensibilité détermine la capacité de ce test à détecter de faibles quantités de l'agent pathogène. Pour tester ce critère de performance, il faut au moins 3 expériences avec des dilutions en série d'un extrait de tissu infecté dans un extrait de tissu sain. Comme la concentration de virus initiale n'est pas connue, cela permet de déterminer la dilution maximale à laquelle l'extrait d'échantillon donne un résultat positif.

La spécificité analytique se détermine par son inclusivité et son exclusivité. L'inclusivité cherche à définir si tous les agents pathogènes d'intérêt sont détectés. Cela se fait en analysant une gamme de variants ou de souches virales couvrant la diversité génétique, ainsi que les différentes origines géographiques et les différents hôtes. Le critère de performance de l'exclusivité cherche à s'assurer que les virus non-ciblés ne sont pas détectés par le test, et il se vérifie en analysant les virus non-ciblés pertinents (par exemple des virus phylogénétiquement proches), en particulier ceux qui pourraient être présents dans la matrice. Pour l'inclusivité et l'exclusivité, les résultats du test peuvent être étayés par une comparaison *in silico* des séquences d'amorces et de sonde avec les séquences des bibliothèques génomiques.

La sélectivité détermine la capacité du test à détecter le virus dans différentes matrices. Ce critère est testé en vérifiant l'influence de différentes matrices sur les performances du test.

La répétabilité du test détermine s'il existe une constance dans les résultats obtenus lors de tests répétés dans les mêmes conditions par un même opérateur, et elle est vérifiée en analysant au minimum 3 répliquats d'échantillons avec une concentration relative faible.

Enfin, la reproductibilité est la consistance des résultats entre différents opérateurs, et cette dernière est vérifiée de la même manière que la répétabilité mais avec des opérateurs différents, à des jours différents.

1.3. Développement de systèmes d'avertissement

Une compréhension approfondie de l'épidémiologie des virus de la jaunisse nanisante (YDV) est essentielle pour assurer un contrôle durable de la maladie.

L'évaluation de l'infectiosité des pucerons est un facteur majeur pour le développement de tout système d'aide à la décision visant à améliorer les stratégies de contrôle du BYDV, et plus généralement les stratégies de lutte intégrée (Fabre et al., 2003). Le réseau français AGRAPHID, un réseau de pièges à succion, recueille des informations standardisées sur la variabilité spatiale et temporelle de la proportion de *Rhopalosiphum padi* virulifères pendant les vols d'automne (Fabre et al., 2005). Toutefois, ce modèle ne prend pas en compte la caractéristique virulifère des pucerons. Le modèle de simulation "BYDV PREDICTOR", développé en Australie occidentale, prédit l'arrivée des pucerons, les épidémies de BYDV et les pertes de rendement dans les cultures de blé dans un environnement de type méditerranéen (Thackray et al., 2009).

1.4. Objectif de l'étude

Les réglementations concernant l'usage de pesticides pour les plantes cultivées deviennent de plus en plus strictes, et de nombreux produits phytosanitaires sont retirés du marché, comme les néonicotinoïdes. Il faut trouver des façons de produire tout en

minimisant le nombre de traitements insecticides. Dans un tel contexte, un suivi et une meilleure compréhension du YDV en Wallonie s'impose.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la possibilité de prédire la gravité des épidémies de YDV sur base de leur prévalence dans les populations de pucerons vecteurs.

Pour atteindre cet objectif global, plusieurs sous-objectifs spécifiques ont été définis :

1. Identifier par échantillonnage les espèces de YDVs et de pucerons principalement responsables de la transmission et de la prévalence de la maladie dans les champs d'orge en Belgique.
2. Evaluer la prévalence de l'espèce majoritaire en Belgique (BYDV-PAV) dans les parcelles étudiées.
3. Evaluer la pression d'inoculum viral du BYDV-PAV en quantifiant la proportion de pucerons virulifères dans les populations collectées à l'automne. Pour ce faire, ce projet inclura la mise au point et la validation d'une méthode de détection basée sur la RT-qPCR pour les pucerons vecteurs.

En combinant les données relatives à l'identification des espèces, à la prévalence et sévérité de la maladie en parcelle et à la proportion de pucerons virulifères, cette étude vise à établir une potentielle corrélation entre la charge virale des populations aphidiennes et l'incidence de la maladie au champ, constituant une étape préliminaire essentielle vers la mise en place d'un système d'alerte précoce.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Echantillonnage

2.1.1. Plants d'orge

Un échantillonnage aléatoire simple a été réalisé sur des parcelles d'orge d'hiver (escourgeon) dans 17 champs répartis à travers les provinces du Hainaut, de Namur, de Liège et du Luxembourg (Table 3 et Figure 5). Pour chaque parcelle, 50 plants ont été récoltés afin de constituer un échantillon représentatif. Les champs d'étude ont été sélectionnés pour être en agriculture biologique, à l'exception d'un seul en agriculture conventionnelle mais sans traitement insecticide. Ce choix méthodologique visait à obtenir une représentation de l'épidémiologie des YDVs la moins biaisée possible en n'influençant pas les dynamiques de populations de pucerons par l'usage de pesticides. Toutefois, d'autres pratiques agricoles, autres que l'utilisation d'insecticides ont une influence sur l'épidémiologie des YDVs, notamment le choix et la gestion des variétés et la gestion des repousses et des graminées sauvages. Les variétés échantillonnées et leur statuts par rapport aux YDVs sont représentées dans le tableau 2.

Variété d'orge d'hiver	Obtenteur principal	Statut BYDV
Carroussel	KWS	Tolérante
Cocinel	RAGT	Tolérante
Comtesse	RAGT	Sensible
Constel	KWS	Tolérante
Démentiel	RAGT	Sensible
Julia	Syngenta	Sensible
Delis	KWS	Tolérante
Joyau	KWS	Tolérante
Salamandre	Limagrain	Sensible
Suez	SAATBAU	Sensible

Tableau 2 : Variétés d'orge échantillonnées, leur obtenteur principal et leur statut par rapport au BYDV.

Les prélèvements ont eu lieu entre le 25 mars et le 23 Avril 2025. Les plantes ont été récoltées entre le stade 29 (fin du tallage) et 55 (fin de l'épiaison) de l'échelle BBCH des céréales.

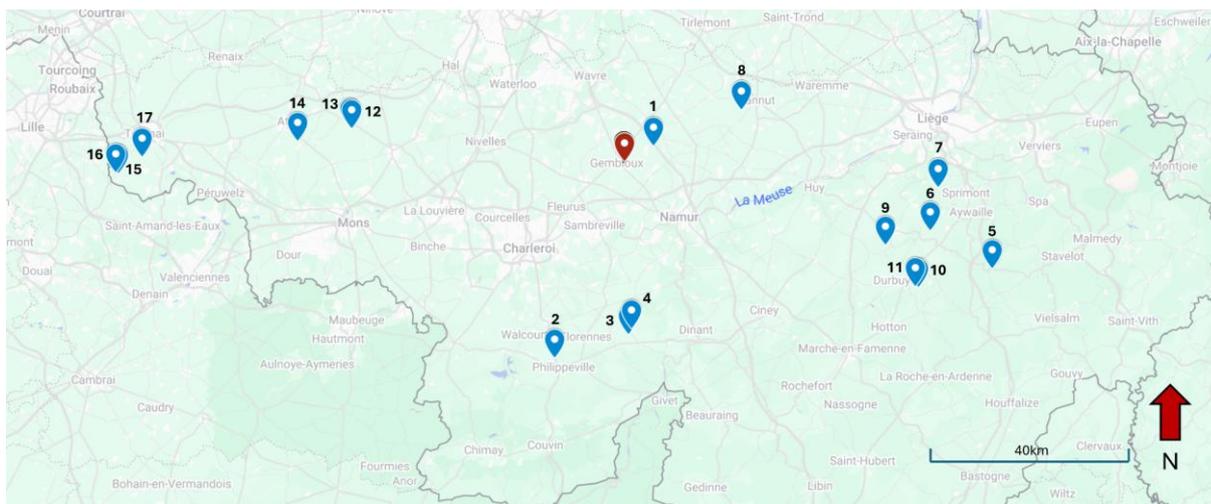


Fig. 5: Parcelles échantillonnées en orge biologique (<https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1hkLIZC5JbqK2-GyF0p1Fwhqe-FvSjl&usp=sharing>) Le point rouge indique la tour à succion du CRA-W de Gembloux.

Champ	Numéro Parcelle	Province	Coordonnées GPS	Var_orge	Date de semis	Date_prelev
Grand Leez	1	Namur	50°35'26.5"N 4°47'27.8"E	Cocinel	24-10-15	25-3-19
Jamagne	2	Namur	50°12'42.8"N 4°30'59.9"E	Démentiel	24-10-24	25-4-4
Flavion 1	3	Namur	50°15'17.5"N 4°43'17.5"E	Julia	24-10-18	25-4-4
Flavion 2	4	Namur	50°15'54.8"N 4°43'47.4"E	Julia	24-10-18	25-4-4
Stoumont	5	Liège	50°22'18.9"N 5°43'57.4"E	Suez	24-10-16	25-4-2
Xhignesse	6	Liège	50°26'25.6"N 5°33'32.4"E	KWS Joyau	24-10-23	25-4-2
Esneux	7	Liège	50°30'59.6"N 5°34'53.2"E	KWS Delis	24-10-16	25-4-2
Thisnes 1	8	Liège	50°39'14.9"N 5°02'07.7"E	Constel	24-10-21	25-4-23
Thisnes 2	8	Liège	50°39'14.9"N 5°02'07.7"E	Carroussel	24-10-21	25-4-23
Thisnes 3	8	Liège	50°39'14.9"N 5°02'07.7"E	Salamandre	24-10-21	25-4-23
Thisnes 4	8	Liège	50°39'14.9"N 5°02'07.7"E	Comtesse	24-10-21	25-4-23
Bende	9	Luxembourg	50°24'51.6"N 5°26'08.9"E	Julia	24-10-15	25-4-2
Morville 1	10	Luxembourg	50°20'16.9"N 5°31'36.8"E	KWS Délis	24-10-4	25-4-2
Morville 2	11	Luxembourg	50°20'22.2"N 5°31'08.1"E	KWS Délis	24-10-4	25-4-2
Thoricourt 2	12	Hainaut	50°37'27.1"N 3°56'49.0"E	KWS Joyau	24-10-5	25-4-22
Thoricourt 1	13	Hainaut	50°37'19.1"N 3°57'08.0"E	KWS Joyau	24-10-5	25-4-22
Chièvres	14	Hainaut	50°35'58.6"N 3°48'02.7"E	KWS Joyau	24-10-31	25-4-22
Rumes 1	15	Hainaut	50°32'31.7"N 3°18'10.4"E	KWS Délis	24-10-5	25-4-22
Rumes 2	16	Hainaut	50°32'35.0"N 3°17'46.4"E	KWS Délis	24-10-5	25-4-22
Ere	17	Hainaut	50°34'14.8"N 3°22'12.3"E	KWS Délis	24-10-7	25-4-22

Tableau 3: Parcelles d'orge échantillonnées

2.1.2. Pucerons

2.1.2.1. Piégeage des pucerons à l'automne

Les pucerons ont été collectés à l'automne 2024, du 1er septembre au 1er décembre, à l'aide de la tour à succion de Gembloux, un piège de type "Rothamsted". Cette tour est intégrée à un réseau de surveillance européen standardisé. Un deuxième piège similaire est d'ailleurs opérationnel en Belgique, à Libramont. Ce dispositif cylindrique de 9 m de haut et 25 cm de diamètre a une capacité d'aspiration de 2 859 m³ d'air par heure grâce à un moteur. Les insectes, capturés à une altitude de 12,2 m, sont dirigés vers un récipient rempli d'une solution savonneuse (1 ml de savon pour 5 L d'eau) pour être piégés. Cette configuration est documentée par J.P. Jansen et A.M. Warnier (2002).

La récolte du récipient est effectuée quotidiennement du lundi au vendredi par un technicien du CRA-W. Les insectes capturés durant les week-ends sont conservés dans le liquide jusqu'à la récolte du lundi, soit un maximum de trois jours. Les pucerons sont

ensuite acheminés au laboratoire pour être triés, comptés et identifiés à l'aide de clés développées par Taylor (1980) et Heie (1980-1995).

Ce réseau de surveillance joue un rôle crucial dans le secteur agricole. Les données collectées permettent de fournir des avis aux agriculteurs sur la pression des pucerons vecteurs de virus de la jaunisse (YDV) pour les céréales, et d'autres virus comme le PVY pour les plants de pomme de terre, les aidant ainsi à optimiser le moment d'application des huiles minérales et des insecticides.

Les espèces de pucerons vectrices des YDV (notamment *R. padi*, *S. avenae*, *R. maidis*, *R. insertum* et *M. dirhodum*) ont été sélectionnées et conservées dans des aliquots remplis d'éthanol absolu dénaturé avec 6% de 2-propanol, au congélateur à -21°C.

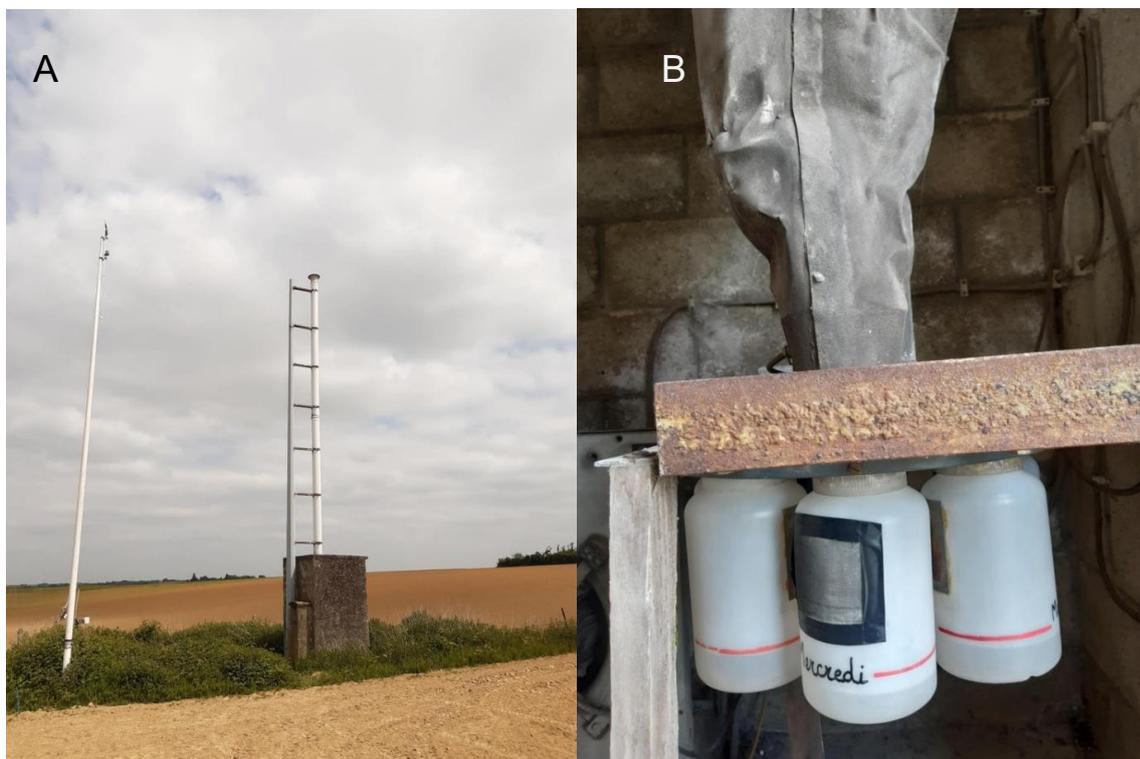


Fig. 6: Tour à succion du Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux (A), récipients dans lesquels les pucerons sont aspirés, un récipient par jour (B)

2.1.2.2. Élevage et maintenance des colonies de pucerons

Afin d'obtenir des pucerons sains et des pucerons virulifères, des colonies de différentes espèces de pucerons (*R. padi*, *S. avenae* et *M. persicae*) ont été élevées au sein des installations du CRA-W. Pour éviter toute contamination croisée, les colonies saines et virulifères étaient maintenues dans deux pièces distinctes. Chaque espèce de puceron était confinée dans des cages à insectes individuelles dotées de moustiquaires.

A l'intérieur de ces cages, les pucerons se nourrissaient sur de jeunes plants d'avoine (*Avena sativa* L.) dont le stade de développement était compris entre BBCH 10 et 21. Les colonies virulifères ont été établies initialement par l'introduction d'un plant de

Sporobolus infecté par l'isolat BYDV-PAV (25/0028/vi), servant de source virale pour les pucerons.

Le renouvellement des plants d'avoine était effectué toutes les deux semaines, ou dès que leur surface était intégralement recouverte de pucerons. De nouveaux plants sains, au stade BBCH 10, étaient introduits dans les cages. Après la migration des pucerons sur ces nouveaux plants, les anciens étaient retirés, garantissant ainsi la persistance du cycle de transmission du virus. L'arrosage des plants était réalisé de manière hebdomadaire.

2.2. Extractions

2.2.1. Préparation de l'échantillon pour l'ELISA

Pour les plantes (symptomatiques et asymptomatiques), 0,2 g d'échantillons de feuilles fraîches sont prélevés, puis découpés pour rentrer dans un tube eppendorf de 2 ml, avec une bille métallique de 0,4 mm de diamètre (billes de récupération de roulements à bille), lavée à la Javel 1% et rincé à l'eau et à l'éthanol. Les échantillons sont broyés au Retsch MM400, pendant 1 minute, avec une fréquence de 30 Hz. Si le contenu du tube reste hétérogène après le premier broyage avec des morceaux de feuille supérieurs à 1 cm, 2 à 3 gouttes de tampon d'extraction (TE) ELISA (Tableau 5) sont introduites dans l'aliquot, et le broyage est réitéré. Après le broyage, on ajoute 1,5 ml de TE à tous les aliquots, et on centrifuge les échantillons pendant 1 minute à 10000 rpm. Seul le surnageant sera utilisé pour le test ELISA. Ils sont ensuite conservés à -21°C.

2.2.2. Broyage d'échantillons des pucerons et de plantes

Chaque puceron transféré par le CRA-W a été placé dans un tube eppendorf de 1,5ml à l'aide d'un pinceau. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant une minute, puis des microbilles de verre de 1mm de diamètre et 20µl de TE (Tableau 5) y sont ajoutés, avant d'être centrifugés à nouveau (10000 rpm pour une minute). L'ensemble est broyé au Retsch MM400 pendant 1 minute à 30 Hz, puis centrifugé à 10000rpm pour une minute. Le jus obtenu est ensuite conservé au frigidaire pour être analysé en RT-qPCR dans les heures qui suivent (période inférieure à 2 heures). L'échantillon n'a pas fait l'objet d'une purification de l'ARN avant l'analyse.

2.2.3. Témoins positifs plante

Les témoins positifs utilisés pour l'analyse DAS-ELISA et RT-qPCR sont repris dans le tableau 4. Les échantillons issus de plante fraîche et de feuilles sont broyés selon la méthode expliquée au point 2.2.2, et les échantillons lyophilisés sont broyés au mortier avec 2ml de tampon d'extraction (Tableau 4).

Tableau 5), et 100µl de cette dilution ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a ensuite été couverte et incubée à 30 °C pendant 4 heures afin de permettre l'adsorption des anticorps.

2.3.2. Procédure de lavage

Entre chaque étape d'incubation (après le coating, après l'antigène et après le conjugué), des lavages rigoureux ont été effectués. Chaque puits a été lavé 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage (TL). Après chaque ajout de TL, la plaque était vigoureusement vidée pour éviter toute contamination inter-puits et éliminer les réactifs non liés. Après le dernier lavage de chaque étape, tout liquide résiduel a été éliminé en tapotant la plaque sur du papier absorbant.

2.3.3. Antigène

Après la phase de revêtement et les lavages subséquents, les extraits de plantes, préalablement homogénéisés dans un tampon d'extraction, ont été ajoutés et 100 µl de chaque extrait ont été déposés dans les puits. La plaque a été couverte et incubée à 4 °C pendant toute une nuit pour permettre la liaison des antigènes viraux (s'ils sont présents) aux anticorps de capture.

2.3.4. Conjugué

Suite à l'incubation de l'antigène et aux lavages, un conjugué enzymatique (anticorps de détection couplé à une enzyme) a été ajouté. Le conjugué a été dilué au 1:1000 dans le tampon d'extraction (Tableau 5), et 100 µl de cette dilution ont été pipetés dans chaque puits. La plaque a de nouveau été couverte et incubée à 30 °C pendant 5 heures pour que le conjugué se lie aux antigènes capturés.

2.3.5. Substrat

Après les lavages finaux, la réaction colorimétrique a été initiée. Le substrat pNPP (p-Nitrophenylphosphate) a été dissous dans un tampon substrat à une concentration finale de 1 mg/ml, puis 100µl de cette solution ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée à température ambiante (20–25 °C) dans l'obscurité jusqu'à ce qu'elles soient analysées par spectrophotométrie.

2.3.6. Lecture des plaques ELISA et interprétation des résultats

La lecture de plaques ELISA par le spectrophotomètre pour microplaques Multiskan FC de la marque Thermo Scientific permet de calculer la Densité Optique (DO) des différents puits. Le développement de la réaction colorimétrique, indiquant la présence de l'enzyme et donc du virus, a été suivi après 60 minutes, à une longueur d'onde de 450 nm. Toutes les données sont enregistrées et encodées dans des fichiers Excel.

Les quatre puits suivants sont nécessaires comme contrôles pour la bonne lecture d'une plaque ELISA : substrat, Bruit de fond (BF), témoin positif (DOTpos) et témoin négatif (DOTneg). Soustraire la valeur de la DO du BF permet de calculer la DO corrigée des puits, et de vérifier si le puits est positif ou négatif, en se basant sur les conditions suivantes: si la DO corrigée est supérieure à 0,1 et si elle est supérieure ou égale à 3 fois la DO corrigée du témoin négatif, alors le puits est considéré comme étant positif. Les autres cas de

figure sont considérés comme étant négatifs et ne sont pas pris en compte dans cette étude.

Il existe un risque de réaction croisée lors de l'utilisation des réactifs du test ELISA en MAV avec le BYDV-PAV, d'environ 25% (Bioreba AG, 2025). Cela signifie que l'anticorps BYDV-MAV ne se lie pas uniquement à sa cible principale (BYDV-MAV), mais aussi à d'autres cibles qui lui ressemblent beaucoup, en l'occurrence BYDV-PAV.

Toutefois, un risque de 25% a deux interprétations : soit 25% des souches de PAV réagiront avec le MAV, soit 100% des souches de PAV réagiront 4x moins au MAV. Afin d'éviter toute surévaluation de la prévalence du BYDV-MAV, nous avons adopté une approche conservatrice. Seuls les échantillons donnant un résultat positif au test du BYDV-MAV et un résultat négatif au test du BYDV-PAV seront considérés comme positifs pour l'analyse de prévalence du BYDV-MAV. Cette méthodologie garantit une spécificité accrue et la fiabilité de nos données sur la pression d'inoculum viral de chaque espèce.

2.3.7. Analyse de la sensibilité du test DAS-ELISA

Afin d'évaluer la sensibilité analytique de la méthode, des extraits de plantes infectées par le BYDV-PAV, le BYDV-MAV et le CYDV-RPV ont été préparés. Ces extraits ont ensuite fait l'objet d'une série de dilutions au dixième dans un extrait de matrice saine (avoine *Avena sativa*, cultivée en chambre de culture par le CRA-W de Gembloux (référence : 13/02/25)), allant de la solution pure (dilution 1x) jusqu'à une dilution de 10⁻⁵. La sensibilité de la technique DAS-ELISA a ensuite été évaluée en analysant la DO corrigée de chaque dilution, avec 2 réplicats techniques par dilution.

2.4. Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) pour la détection de l'ARN du virus BYDV-PAV dans les pucerons

2.4.1. Test de détermination du meilleur ratio sonde et amorces

Le test de concentration des sondes et amorces cherche à définir quelles concentrations en sonde et amorces seraient optimales pour la RT-qPCR. Neuf mix réactionnels différents ont été testés, chacun avec sa propre concentration en sonde et en amorces, et chaque mix a été testé avec 4 échantillons positifs différents : BYDV-PAV (25/0028/vi) dilué 2x, 20x et 200x dans de l'avoine négative (13/02/25) et BYDV-MAV (23/0396/vi02).

	Sonde (μl)		
Amorces (μl)	0,15	0,2	0,25
0,2	Mix 1	Mix 2	Mix 3
0,3	Mix 4	Mix 5	Mix 6
0,4	Mix 7	Mix 8	Mix 9

Tableau 6 : Concentrations des amorces et de la sonde dans les 9 mix réactionnels différents.

2.4.2. Protocole RT-qPCR

Le jus brut de puceron est ensuite testé par RT-qPCR, afin de connaître la présence du BYDV-PAV dans chaque puceron individuel. La réaction se fait en une étape. Les amorces sont BYDV-F (20μM) et BYDV-R (20μM), et la sonde BYDV-PAV-Pr (20μM) est utilisée. Elles

ont été conçues spécialement pour la détection de BYDV-PAV par Rt-qPCR par Pierre Hellin, chercheur au laboratoire de virologie du CRA-W de Gembloux. Les séquences des oligonucléotides sont reprises dans le tableau 7.

Sonde/Amorce	Fournisseur	Référence	Séquences d'oligonucléotides (sens 5'-3')
BYDV-F	Eurofins Genomics	24/0497/vi11	CACAACCACTGGCCGAA
BYDV-R	Eurofins Genomics	24/0497/vi12	ACCACTAGAGAGGTGGTGAA
BYDV-PAV-Pr	Eurofins Genomics	25/0040/vi01	TGAATTCAGTAGGCCGTAGAGGACCT

Tableau 7: séquences d'oligonucléotides des amorces et de la sonde pour la RT-qPCR BYDV

Des strips (Eppendorf) ou plaques de puits blancs (Biorad) en polypropylène sont utilisés. Chaque puits est rempli avec 18µl de mix réactionnel et 2µl de jus de puceron. Il y a 4 puits contrôle par RT-qPCR (EPPO, 2021): Positive Amplification Control (PAC) (extraction de puceron positive ayant déjà été testée positive), Negative Amplification Control (NAC) (mix réactionnel + eau RNase free), Positive Extraction Control (PEC) (puceron issu de l'élevage positif, même extraction que les échantillons) et Negative Extraction Control (NEC) (puceron négatif, même extraction que les échantillons). L'ensemble des puits est centrifugé, puis inséré dans le CFX Connect Real-Time PCR Detection System, qui suit le cycle suivant: 10 minutes à 50°C, puis 3 minutes à 95°C, et ensuite quarante fois un cycle de 15 secondes à 95°C et 45 secondes à 60°C.

Pour visualiser et analyser les courbes d'amplification de la RT-qPCR, le logiciel utilisé est Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, 2012). Il trace l'augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. La baseline de l'analyse (phase initiale de la réaction de qPCR, où le signal de fluorescence est faible et stable) est fixée automatiquement, et le seuil de fluorescence (valeur qui correspond au signal au dessus du bruit de fond) est fixé manuellement à 760,09 RFU (10^3). Les cycles de quantification (*Cycle threshold* en anglais (Ct)) correspondent au nombre de cycles au cours duquel la courbe d'amplification d'un échantillon atteint le seuil de fluorescence. Plus la quantité initiale d'ARN est grande, plus le Ct est bas.

2.4.1.1. Sensibilité analytique

Pour évaluer la sensibilité analytique de la méthode de détection, nous avons réalisé des dilutions en série au dixième, jusqu'à une dilution 10^{-4} de la concentration initiale, à partir de cinq *R. padi* individuellement infectés (réplicats biologiques). Chaque puceron infecté a été dilué dans du jus de *R. padi* sains. Étant donné que la concentration initiale d'ARN viral n'était pas connue, l'objectif principal de cette approche était de déterminer la dilution maximale pour laquelle notre test RT-qPCR donnait un résultat positif. Chaque dilution (y compris la solution pure) a été analysée avec un réplicat technique.

La sensibilité analytique du test RT-qPCR a également été évaluée en utilisant une série de dilutions d'ARN viral purifié. L'ARN a été extrait d'une plante de *Sporobolus* infectée par le BYDV-PAV (25/0028/vi, cf. Tableau 4) à l'aide d'un kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant and Fungi (Macherey-Nagel, 2025). Cet ARN viral purifié a ensuite été dilué en série au dixième dans un extrait d'ARN purifié de plante saine (*A. sativa*, échantillon du 13/02/25, cf. point 2.3.7), de la solution pure (1x) jusqu'à une dilution de 10^{-7} . Chaque dilution a été analysée par RT-qPCR, avec deux réplicats techniques et un réplicat biologique par dilution, afin de garantir la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

La pente de la régression linéaire de ces dilutions est calculée, et comparée à la valeur idéale d'une pente de régression linéaire, qui doit être au plus proche de -3,32 et comprise entre -3,6 et -3,1 pour que l'efficacité d'amplification soit validée (Bustin et al., 2009).

2.4.1.2. Spécificité analytique

Le test de spécificité consiste à vérifier que les amorces et la sonde d'une PCR sont inclusives (capables de détecter un large éventail de variants du virus cible), tout en étant exclusives (incapables de se lier à des séquences d'autres virus ou de l'hôte non-cibles).

De façon *in vitro*, un test RT-qPCR sera réalisé avec un échantillon positif PAV (inclusivité), PAS et MAV (exclusivité). Cette approche est détaillée dans la section 1.2.3. L'inclusivité et l'exclusivité ont été également testée *in silico*.

2.4.1.2.1. Inclusivité *in silico*

Afin d'évaluer la spécificité et l'inclusivité théorique de l'essai, une analyse *in silico* a été réalisée. Les séquences de nucléotides du BYDV-PAV (TaxID : 2169986) ont été téléchargées depuis la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>), puis ont été soumises à un alignement multiple à l'aide du logiciel Unipro UGENE (version 52.1) (Okonechnikov et al., 2012) afin d'identifier les régions du génome viral les plus conservées et les zones présentant une variabilité génétique significative. Pour l'alignement multiple des séquences, l'algorithme MAFFT (version 6.864) (Katoh et al., 2002) a été utilisé.

L'alignement a été effectué à l'aide de l'algorithme MAFFT pour garantir une haute précision, avec un *gap penalty* de 10. Ce paramètre permet d'éviter les délétions lors de l'alignement des séquences. L'algorithme préférera aligner des séquences en mettant des bases non identiques face à face, même si elles sont moins similaires. L'ensemble des paramètres d'alignement sur UGENE est disponible en annexe (Annexe 1).

Les séquences de nos amorces et de notre sonde ont été positionnées sur l'alignement multiple afin de vérifier leur complémentarité. Après un examen initial, seules les séquences contenant la région génomique ciblée par les amorces et la sonde ont été conservées pour l'analyse, les autres étant éliminées de l'ensemble de données.

Enfin, pour quantifier et visualiser la conservation des sites de liaison, des séquences logo (représentation graphique qui illustre la fréquence de chaque base à une position donnée) ont été générés grâce au site WebLogo (version 2.8.2 : <https://weblogo.berkeley.edu/>) à partir des régions d'alignement correspondant à nos amorces et notre sonde. La hauteur de la lettre correspond à sa fréquence relative : plus la lettre est haute, plus la base est conservée à cette position.

L'analyse de la sélectivité est basée sur un critère de correspondance entre les nucléotides de la sonde et des amorces avec les séquences de nucléotides des virus, en comptant le pourcentage de *mismatch* par nucléotide sur l'ensemble des séquences. L'analyse s'est également concentrée sur les cinq nucléotides de l'extrémité 3' des amorces, car leur appariement avec la matrice est critique pour l'efficacité de la polymérase (Kwok et al., 1990, Simsek et al., 2000).

La validation de l'inclusivité repose sur le respect des critères suivants :

Seuil d'appariement : Un test est considéré comme inclusif si la séquence des amorces et de la sonde présente un mésappariement ou moins sur les cinq derniers nucléotides de l'extrémité 3' pour l'ensemble des séquences analysées, car les *mismatches* à l'extrémité 3' empêchent la polymérase de reconnaître l'amorce, pouvant entraîner à de faux amorçages, le problème étant l'absence de double brin, indispensable à l'enzyme Taq polymérase (Singh et Kumar, 2001).

Considération des mésappariements totaux : Un nombre de mésappariements totaux acceptable sur l'ensemble de la séquence des amorces et de la sonde doit être observé, afin de garantir une amplification efficace pour tous les variants de l'espèce.

2.4.1.2.2. Exclusivité *in silico*

L'exclusivité théorique des amorces et de la sonde ciblant le BYDV-PAV a été évaluée à l'aide de la même méthode que pour le test d'inclusivité (cf 2.4.1.2.1.), basée sur des critères de validation différents. Les séquences de nucléotides des espèces non ciblées, à savoir le BYDV-MAV (TaxID: 12285) et le BYDV-PAS (TaxID: 29837) ont été téléchargées depuis la base de données du NCBI. Ces séquences, ont été soumises à un alignement multiple pour générer des séquences logo (cf. « Inclusivité *in silico* »).

Pour quantifier le risque de réaction croisée, une analyse des *mismatches* a été réalisée. Pour chaque nucléotide de nos amorces et de notre sonde, la compatibilité avec les séquences de BYDV-MAV et de BYDV-PAS a été évaluée. Ces deux espèces de YDVs ont été sélectionnées pour étudier l'exclusivité du test car ce sont 2 espèces phylogénétiquement proches de BYDV-PAV, et des échantillons de BYDV-MAV et BYDV-PAS sont disponibles pour vérifier ces tests d'inclusivité *in silico* de façon *in vitro*.

La validation de l'exclusivité repose sur les critères suivants :

Seuil d'appariement : le test est considéré comme exclusif si la séquence des amorces et de la sonde présente au moins un mismatch sur les cinq derniers nucléotides de l'extrémité 3' avec les séquences des virus non ciblés.

Considération des mésappariements totaux : un nombre suffisant de mésappariements totaux sur l'ensemble de la séquence des amorces et de la sonde doit être observé pour valider l'exclusivité.

2.4.1.3. Sélectivité

Un test de sélectivité a été réalisé en comparant la détection de BYDV-PAV dans les pucerons ailés et aptères. Afin d'évaluer les différences potentielles dans la prévalence et la charge virale entre ces deux morphotypes, un ensemble de 10 pucerons ailés et un autre de 10 pucerons aptères tous positifs au BYDV-PAV et collectés à des dates et élevages identiques, ont été broyés individuellement, selon la méthode décrite au point 2.2.2., puis testés par RT-qPCR avec un réplicat technique par puceron, et les Ct obtenus permettent de connaître la quantité de virus par puceron. Par la suite, un test ANOVA réalisé dans Excel (version 2408) cherche à voir s'il existe une différence significative entre les différents Ct obtenus pour les 2 morphotypes de puceron. Ce test vise à voir s'il existe une différence pour la détection du virus BYDV-PAV entre les 2 types de pucerons,

étant donné que les tests RT-qPCR ont été réalisés sur des pucerons aptères d'élevage, tandis que les pucerons capturés à l'automne sont des pucerons ailés.

La sélectivité a été testée en diluant un puceron *R. padi* (par 3 réplicats biologiques) dans du jus de puceron sain de *R. padi*, *M. persicae* et *S. avenae*, avec des dilutions de 10 en 10 dans la même espèce de puceron sain, jusqu'à une dilution 10^3 fois. Le contrôle positif de matrice (matrice homologue), lors de la dilution de l'échantillon dans du *R. padi* sain permet de s'assurer que l'extraction et l'amplification fonctionnent correctement et que la matrice n'inhibe pas la réaction. Les contrôles de matrice hétérologues (dilution dans *M. persicae* et dans *S. avenae*) permettent de vérifier si ces matrices contiennent des inhibiteurs qui pourraient affecter la performance du test. Une analyse RT-qPCR a été réalisée sur ces différentes dilutions. Ces espèces ont été sélectionnées en fonction de leur pertinence concernant la transmission de BYDV et de leur disponibilité au CRA-W. *R. padi* est un vecteur majeur du BYDV-PAV et une matrice très fréquente, *S. avenae* est une espèce de puceron fréquente dans les champs de céréales et *M. persicae* pertinente car c'est une espèce éloignée des autres et qui est disponible au laboratoire du CRA-W.

2.4.1.4. Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité biologique, nous avons sélectionné 5 pucerons différents (répétabilité biologique), présumés positifs au BYDV-PAV car issus de l'élevage du CRA-W mentionné précédemment. Ces pucerons ont été préparés individuellement et dilués $\times 1000$ dans du jus de *R. padi* sain. Huit réplicats techniques par puceron ont été testés en RT-qPCR.

2.4.1.5. Reproductibilité

Le test de dilution de la sensibilité analytique (au point 2.4.1.1.) des pucerons a été conduit une deuxième fois sur 5 autres pucerons, par Pauline Richet, technicienne du laboratoire de virologie du CRA-W selon la même procédure, à un jour différent.

2.5. Tests d'optimisation de l'analyse de BYDV-PAV dans les pucerons

2.5.1. Méthode de conservation des pucerons

Un test d'optimisation a été mené pour évaluer l'impact du temps de conservation des pucerons récoltés par la tour à succion du CRA-W. En effet, les pucerons peuvent rester pendant des temps différents dans le liquide de piégeage de la tour à succion à température ambiante, allant de quelques minutes (si le puceron vient tout juste de tomber dans le piège) à 3 jours (le puceron est tombé dans le piège juste après la dernière récolte de la semaine et sera récolté en début de la semaine suivante). Afin de voir si cette différence de temps de trempage à température ambiante a une influence sur le Ct des pucerons positifs, une RT-qPCR a été réalisée avec trois groupes de pucerons différents issus du même élevage : 15 pucerons trempés pendant 2 minutes, 15 pucerons pendant 24 heures et 15 pucerons durant 3 jours).

2.5.2. Contamination croisée

Pour vérifier si des cas de contamination croisée (transfert accidentel d'un agent infectieux d'un échantillon à un autre) peuvent avoir lieu dans les pots de piégeage des pucerons, un test RTqPCR a été réalisé sur des *R. padi* positifs et négatifs ayant été conservés ensemble pendant 24 heures avec des ratios différents par bocal. Trois bocal

contenaient 9 positifs et 1 négatif, 3 bocaux contenaient 5 positifs et 5 négatifs, et 3 bocaux contenaient 1 positif et 9 négatifs. Tous les pucerons ont ensuite été testés individuellement.

2.6. Analyse statistique, traitement des données et test ANOVA

Les données de Ct obtenues ont été utilisées pour évaluer la répétabilité, la reproductibilité et la sélectivité du test RT-qPCR pour la détection du BYDV-PAV. Les valeurs de Ct moyennes et les écarts-types ont été calculés pour les réplicats techniques et biologiques. Pour la sensibilité, les courbes de dilution ont été générées en traçant les valeurs de Ct en fonction du logarithme base 10 du facteur de dilution (Log10(Facteur de Dilution)). Les pentes et les ordonnées à l'origine de ces courbes ont été déterminées par régression linéaire dans le logiciel Excel (version 2408).

Pour l'estimation de la prévalence du BYDV-PAV et BYDV-MAV dans les parcelles échantillonnées et testées par la méthode DAS-ELISA, les intervalles de confiance (IC) à 95 % ont été calculés. L'intervalle de Wilson a été calculé pour l'ensemble des parcelles, car il est considéré comme fondamentalement suffisant et nettement supérieur à l'intervalle de Wald, pourtant plus simple à calculer, mais qui présente des intervalles inappropriés proche des bornes 0 et 1 (Newcombe, 1998).

Le calcul des IC est le suivant:

$$IC_{Wilson} = \left[\frac{\hat{p} + \frac{Z^2}{2n} - Z \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} + \frac{Z^2}{4n^2}}}{1 + \frac{Z^2}{2n}} ; \frac{\hat{p} + \frac{Z^2}{2n} + Z \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n} + \frac{Z^2}{4n^2}}}{1 + \frac{Z^2}{2n}} \right]$$

L'intervalle de Wilson est considéré comme un IC aux propriétés robustes et précises, en particulier pour les proportions faibles, et très efficace dans les cas de petits échantillons comme n=50 (Wilson, 1927 ; Brown et al., 2001).

Les calculs ont été réalisés avec un score Z égal à 1,96. Ce score est une mesure statistique qui indique le nombre d'écarts-types dont une valeur donnée s'écarte de la moyenne de sa distribution. La valeur 1,96 est la valeur critique pour un intervalle de confiance de 95 % dans le cadre d'un test bilatéral. Enfin, des tests ANOVA ont été réalisés pour vérifier s'il y avait une différence significative entre plusieurs variables. Les calculs d'IC et d'ANOVA ont été réalisés dans le logiciel Excel (version 2408).

3. Résultats

3.1. Test ELISA en BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV

3.1.1. Sensibilité du test DAS-ELISA

Dilution	DO RépTech1	DO RépTech2	Moyenne DO	Ecart-type DO	Coef Var
Dil 0	0,91	1,10	1,09	0,14	12,41
Dil 10	0,13	0,13	0,13	0,00	0,53
Dil 10 ²	0,01	0,00	0,01	0,00	58,93
Dil 10 ³	0,00	-0,01	-0,01	0,00	-51,43
Dil 10 ⁴	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dil 10 ⁵	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,00

Tableau 8 : DO corrigées de la dilution de plante positive au BYDV-PAV dans plante négative testée par la méthode DAS-ELISA, 2 réplicats techniques

La moyenne des 2 premiers échantillons (dilutions 0x et 10x) testés avec les anticorps BYDV-PAV donne un résultat positif (cf partie 2.3.6.). L'ensemble des tests menés avec les anticorps BYDV-MAV et CYDV-RPV donnent des résultats négatifs, bien que les tests soient validés par les témoins positifs et négatifs (annexe 2). On peut en conclure que la sensibilité de ce test est faible, et qu'il est exclusif au BYDV-MAV et CYDV-RPV.

3.1.2. Prévalence en parcelle d'orge de BYDV-PAV

Pour visualiser et analyser la répartition spatiale de la prévalence du virus BYDV-PAV à l'échelle de la Wallonie, une carte thématique a été élaborée. Cette représentation graphique est un outil essentiel pour comprendre les dynamiques épidémiologiques du virus et identifier d'éventuels foyers ou zones à risque préférentiel. Chaque point échantillonné, correspondant à une parcelle d'orge étudiée, est illustré par un diagramme secteur (Figure 7), offrant une synthèse visuelle immédiate de nos résultats. Les IC à 95% (sur base de la valeur estimée) des parcelles sont disponibles dans le Tableau 9.

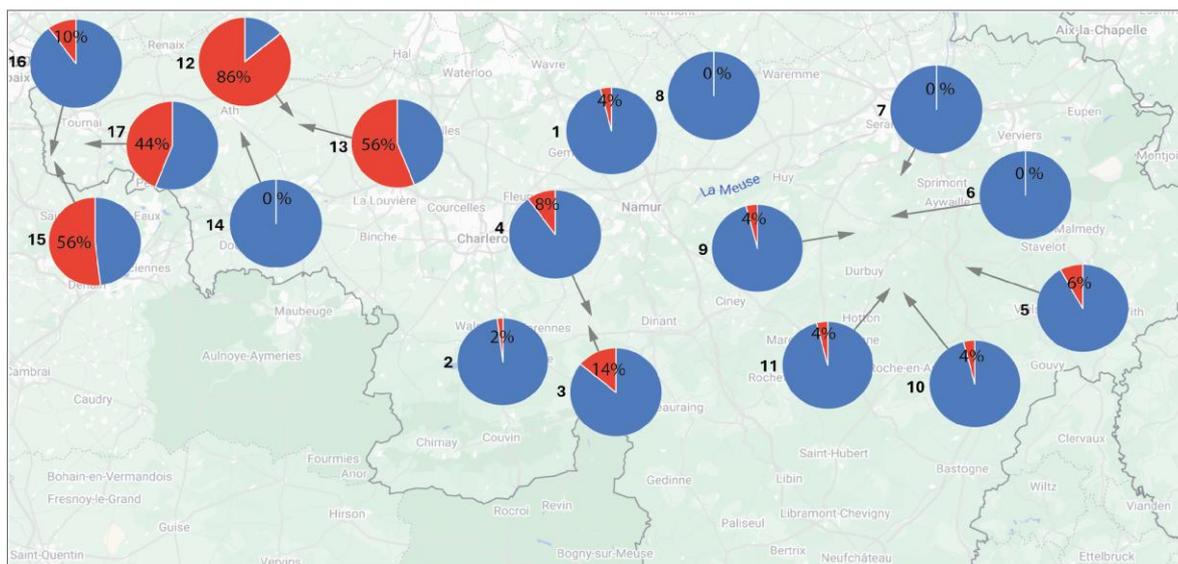


Figure 7: Prévalence du BYDV-PAV au sein de parcelles d'orge échantillonnées en Wallonie (50 échantillons par parcelle testés par la technique DAS-ELISA). En rouge, le pourcentage de plants atteints en BYDV-PAV.

Numéro Parcelle	Prévalence Observée (%)	Intervalle de confiance PAV (%)	Largeur IC (%)
1	4	[1,1 ; 13,5]	12,4
2	2	[0,4 ; 10,5]	10,1
3	14	[7,0 ; 26,2]	19,2
4	8	[3,2 ; 18,8]	15,7
5	6	[2,1 ; 16,2]	14,2
6	0	[0,00 ; 7,1]	7,1
7	0	[0,00 ; 7,1]	7,1
8	0	[0,00 ; 7,1]	7,1
9	4	[1,1 ; 13,5]	12,4
10	4	[1,1 ; 13,5]	12,4
11	4	[1,1 ; 13,5]	12,4
12	86	[73,8 ; 93,1]	19,2
13	56	[42,3 ; 68,8]	26,5
14	0	[0,00 ; 7,1]	7,1
15	52	[38,5 ; 65,2]	26,7
16	10	[4,4 ; 21,4]	17,0
17	44	[31,2 ; 57,7]	26,5

Tableau 9: Estimation de la prévalence de BYDV-PAV par calcul d'un Intervalle de Confiance selon la méthode de Wilson pour les différentes parcelles d'orge

Treize champs sur les dix-sept champs échantillonnés ont au moins une plante positive, soit 76,5% des parcelles.

Trois champs sur dix-sept (soit 17,6%) ont une prévalence observée de BYDV-PAV supérieure à 50%.

3.1.3. Prévalence BYDV-MAV et CYDV-RPV

3.1.3.1. BYDV-MAV

Les tests en BYDV-MAV ont donné des résultats insatisfaisants, avec des témoins positifs qui sortaient en négatif. Pour identifier la source du problème, le test a été réitéré avec l'ensemble des 4 autres témoins positifs MAV disponibles (références : 04/18/03/92 ; 14/28/02/92 ; 18/03/02/04/92 ; 24/01/22/vi02), mentionnés dans le tableau 4 (cf partie 2.2.3.). Les résultats n'ont cependant pas donné lieu à des valeurs positives pour ces témoins testés. L'hypothèse que les anticorps utilisés n'étaient plus fonctionnels a été faite, et l'ELISA a été réitérée avec de nouveaux anticorps BYDV-MAV et CYDV-RPV de la même marque (Bioreba AG, 2025), mais les résultats pour les témoins positifs étaient toujours négatifs.

Toutefois, 2 tests ELISA ont donné des résultats positifs en BYDV-MAV. Sur base du point 2.3.6., on a sélectionné tous les échantillons positifs en BYDV-MAV et négatifs en BYDV-PAV, et créé une carte de prévalence du BYDV-MAV, ainsi qu'un tableau des intervalles de confiance des parcelles positives.

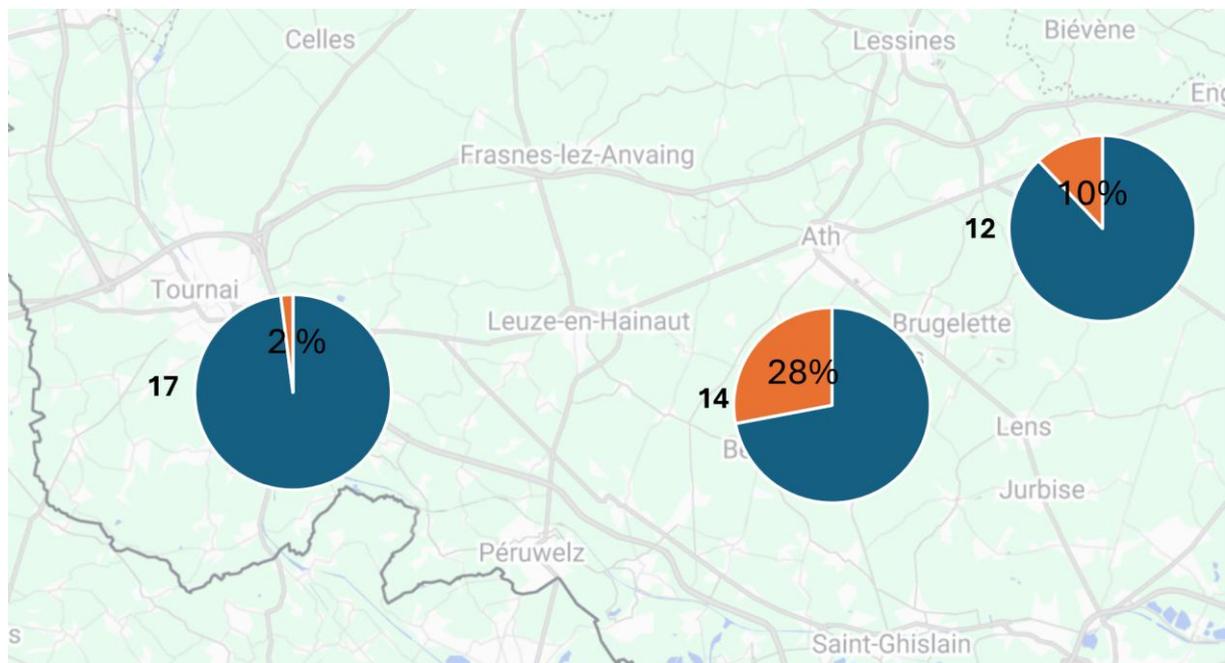


Figure 8 : Prévalence du BYDV-MAV au sein de parcelles d'orge échantillonnées en Wallonie (50 échantillons par parcelle testés par la technique DAS-ELISA). En rouge, le pourcentage de plants atteints en BYDV-MAV.

Numéro Parcelle	Prévalence Observée (%)	Intervalle de confiance MAV (%)	Largeur IC (%)
12	12	[4,4 ; 21,4]	17,0
14	28	[17,5 ; 41,7]	24,2
17	2	[0,4 ; 11,0]	10,6

Tableau 10 : Estimation de la prévalence de BYDV-MAV par calcul d'un Intervalle de Confiance selon la méthode de Wilson pour les différentes parcelles d'orge

Trois champs sur dix-sept (soit 17,6%) avaient au moins une plante positive, et on y observe une prévalence comprise entre 2 et 28% de BYDV-MAV. Les intervalles de

confiance sont étroits et indiquent une estimation précise de la population réellement atteinte dans la parcelle.

Toutefois, l'estimation de prévalence par DAS-ELISA des échantillons positifs au BYDV-MAV et négatifs au BYDV-PAV n'est pas idéale, étant donnée que l'on peut trouver fréquemment des échantillons co-infectés. Cette méthodologie sous-estime la prévalence réelle en BYDV-MAV.

3.1.3.2. CYDV-RPV

Les tests en CYDV-RPV ont également donné des résultats insatisfaisants, avec les témoins positifs qui sortaient en négatifs. Toutefois, aucun autre échantillon vérifié en CYDV-RPV n'a pu être testé, par manque de disponibilité.

Les tests RPV ont donné 2 échantillons positifs lors d'un test ELISA (tandis que le témoin positif ne sortait pas positif). Ces 2 échantillons ont été testé à nouveau, mais sont sortis négatifs lors des tests ultérieurs.

3.2. Validation et vérification du test RTqPCR

3.2.1. Concentration sonde et amorces pour la RT-qPCR

Le tableau 11 reprend les valeurs de Ct obtenues pour les 9 mix différents testés en RT-qPCR, sur les dilutions de BYDV-PAV dans de l'eau RNase free (dil 2x, dil 20x et dil 200x) et sur un échantillon de BYDV-MAV (23/0396/VI02).

PAV dil 2x	Sonde (µl)			PAV 20x	Sonde (µl)		
Amorces (µl)	0,15	0,2	0,25	Amorces (µl)	0,15	0,2	0,25
0,2	17,1	17,11	16,9	0,2	20,58	20,29	20,01
0,3	16,68	16,61	16,45	0,3	19,87	19,9	19,82
0,4	16,48	16,34	16,24	0,4	20,02	19,56	19,65
PAV dil 200x	Sonde (µl)			MAV	Sonde (µl)		
Amorces (µl)	0,15	0,2	0,25	Amorces (µl)	0,15	0,2	0,25
0,2	23,82	23,68	23,7	0,2	36,33	37,3	35,49
0,3	23,53	23,42	23,15	0,3	36	35,41	34,82
0,4	23,39	23,2	23,05	0,4	34,64	34,79	34,81

Tableau 11 : Ct obtenus lors du test de 9 mix réactionnels (concentrations sonde et amorces différentes) sur des dilutions de BYDV-PAV et sur un échantillon de BYDV-MAV.

Cela nous aide à déterminer quel mix réactionnel est le plus pertinent à utiliser dans notre cas de figure. Ces tableaux montrent qu'il n'existe pas de mix idéal qui remplit toutes les conditions d'un bon mix réactionnel (Ct faible pour la détection d'isolat recherché (ici, PAV) et Ct élevé pour la détection d'isolat non recherché (ici, MAV). Il y a donc une limitation dans l'exclusivité de ce protocole.

Ces tableaux permettent de trouver le Ct optimal, soit le plus faible possible pour les dilutions de BYDV-PAV et le plus élevé possible pour le test BYDV-MAV.

Le mix réactionnel qui permet de bien détecter le PAV et ses différentes dilutions, sans toutefois détecter le MAV trop tôt est le mix réactionnel 6.

Réactif	Volume (μL)
Eau	11,75
Tampon	5
BYDV-F (20μM)	0,3
BYDV-R (20μM)	0,3
BYDV-PAV-Pr (20μM) FAM	0,25
Enzyme	0,4

Tableau 12: Composition du mix réactionnel utilisé pour la RT-qPCR pour le BYDV-PAV

3.2.2. Evaluation de la sensibilité analytique

3.2.2.1. Dilution puceron positif BYDV-PAV dans puceron sain

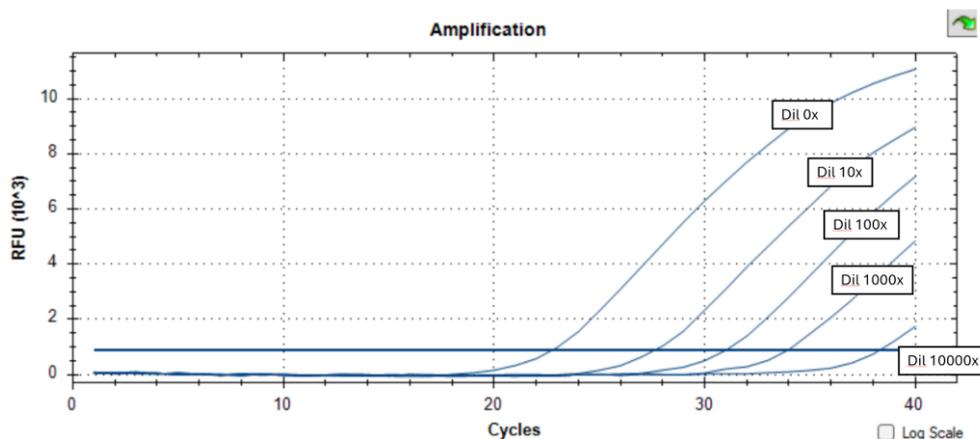


Figure 9 : Test de sensibilité analytique de la RT-qPCR pour la dilution du puceron 2

Résultats Opé	Puceron 1	Puceron 2	Puceron 3	Puceron 4	Puceron 5	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Var
Dil 0	25,12	22,70	22,18	23,12	25,13	23,65	1,39	5,86
Dil 10	27,01	27,57	26,51	27,41	28,1	27,32	0,60	2,19
Dil 10 ²	30,33	30,95	29,88	30,75	31,53	30,69	0,62	2,04
Dil 10 ³	33,81	33,90	33,26	34,33	34,57	33,97	0,51	1,49
Dil 10 ⁴	37,31	38,26	33,24	37,54	38,45	36,96	2,13	5,77

Tableau 13: Valeurs des Ct pour chaque puceron individuel, moyenne, écart type et coefficient de variation de chaque dilution.

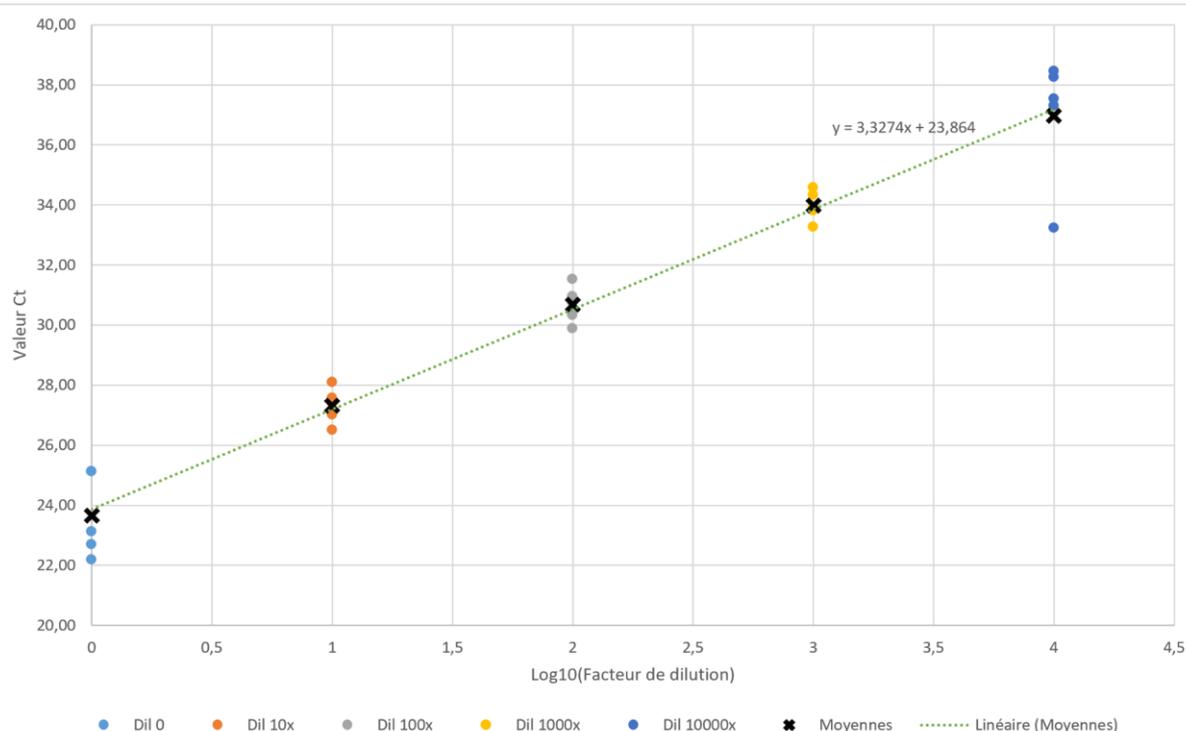


Figure 14 : Diagramme scatter plot des valeurs obtenues pour chaque dilution de pucerons positifs au BYDV-PAV (5 répliquats biologiques), dilués dans du jus de *R. padi* négatif, avec la régression linéaire des moyennes de chaque dilution

La pente de la courbe standard de la RT-qPCR a une valeur de 3,327, ce qui est très proche de la valeur idéale d'une pente de régression linéaire. L'ordonnée à l'origine de la pente de régression a un Ct de 23,86, ce qui représente un amplification hâtive du BYDV-PAV.

3.2.2.2. Dilution plante positive au BYDV-PAV dans matrice plante saine

Dilution	Ct RépTech1	Ct RépTech2	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Var
Dil 0	15,52	15,60	15,56	0,06	0,36
Dil 10	18,04	17,96	18,00	0,06	0,31
Dil 10 ²	21,17	21,26	21,22	0,06	0,30
Dil 10 ³	24,44	24,35	24,40	0,06	0,26
Dil 10 ⁴	28,24	28,05	28,15	0,13	0,48
Dil 10 ⁵	31,81	31,73	31,77	0,06	0,18
Dil 10 ⁶	35,14	34,69	34,92	0,32	0,91
Dil 10 ⁷	37,11	38,65	37,88	1,09	2,87

Tableau 14: Valeurs des Ct pour les dilutions des 2 répliquats techniques de BYDV-PAV dans la matrice de plante saine (*A. avenae*, cf. point 2.3.7.), moyenne, écart type et coefficient de variation de chaque dilution.

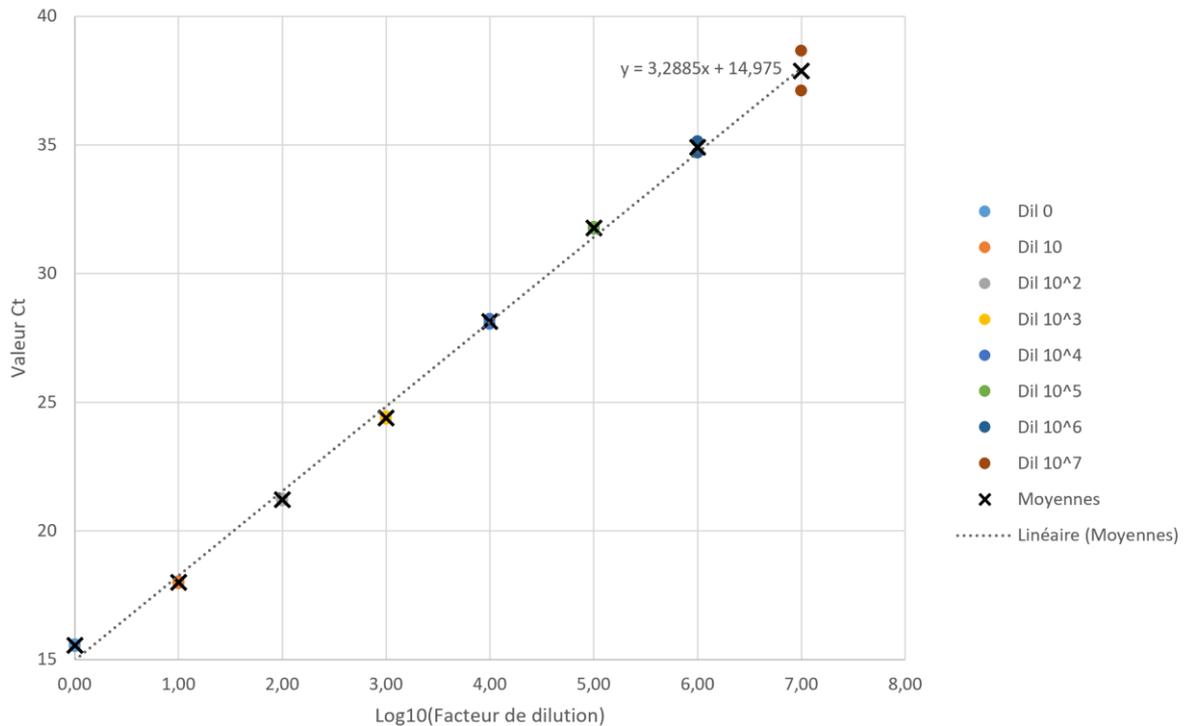


Figure 15 : Diagramme scatter plot des valeurs obtenues pour chaque dilution d'ARN de plante positif au BYDV-PAV (2 réplicats techniques), dilués dans du jus de *A. sativa* négatif, avec la régression linéaire des moyennes des dilutions

La pente de la courbe standard de la RT-qPCR a une valeur de 3,29, ce qui est très proche de la valeur idéale d'une pente de régression linéaire.

3.2.3. Spécificité analytique

3.2.3.1 Inclusivité

Les séquences de NCBI ont été analysées et comparées avec la séquence des 2 amorces (Forward et Reverse) et de la sonde. Au total, 148 séquences ont été analysées pour le BYDV-PAV. Cela permet de donner des pourcentages de *mismatch* en fonction de chaque nucléotide. Le nombre de mésappariement (*mismatch* en anglais) par nucléotide donne une information importante sur l'inclusivité d'un test RT-qPCR. Les séquences logo suivantes permettent de visualiser la conservation des nucléotides à chaque position au sein de l'alignement.

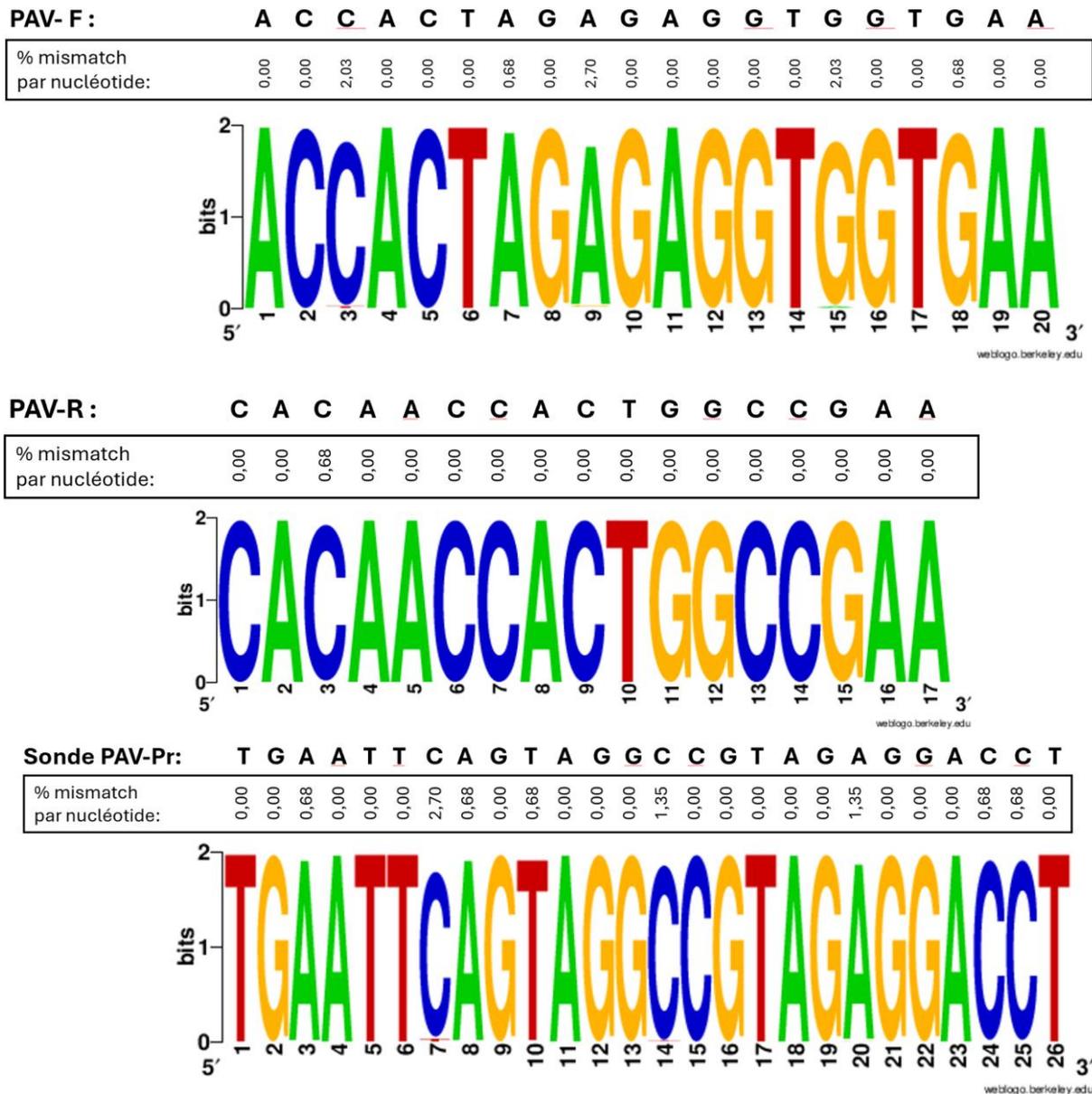


Figure 16: Inclusivité des amorces et de la sonde BYDV-PAV sur base des séquences logo développées à partir des 148 séquences de nucléotides de BYDV-PAV

Nombre de mismatch PAV	0	1	2	3
Amorce PAV F	140	4	4	0
Amorce PAV R	147	1	0	0
Sonde PAV	136	11	1	0
PAV F + PAV R + PAV Sonde	130	12	6	1

Tableau 15: Inclusivité des amorces et de la sonde sur base du nombre de mismatch par sonde et amorce individuelle, ainsi que pour la combinaison des trois.

Sur base de cette analyse *in silico*, les amorces et sondes se révèlent très spécifiques et incluent une grande quantité des séquences connues de BYDV-PAV. Le taux de

séquences n'ayant aucun *mismatch* pour la combinaison amorces et sonde est de l'ordre de 87,8%. Le pourcentage de *mismatch* maximal pour une position est de 2,7% (4 nucléotides sur 141). De plus, les *mismatches* repérés ne se situent pas sur les nucléotides de l'extrémité 3' des séquences.

3.2.3.2. Exclusivité

BYDV-MAV

Les 40 séquences de l'espèce BYDV-MAV trouvées sur GenBank ont dû être divisées en 2 groupes assez homogènes entre eux. Les deux groupes de séquences MAV (MAVa, 17 échantillons, et MAVb, 23 échantillons) seront utilisés séparément pour étudier la spécificité des amorces et de la sonde.

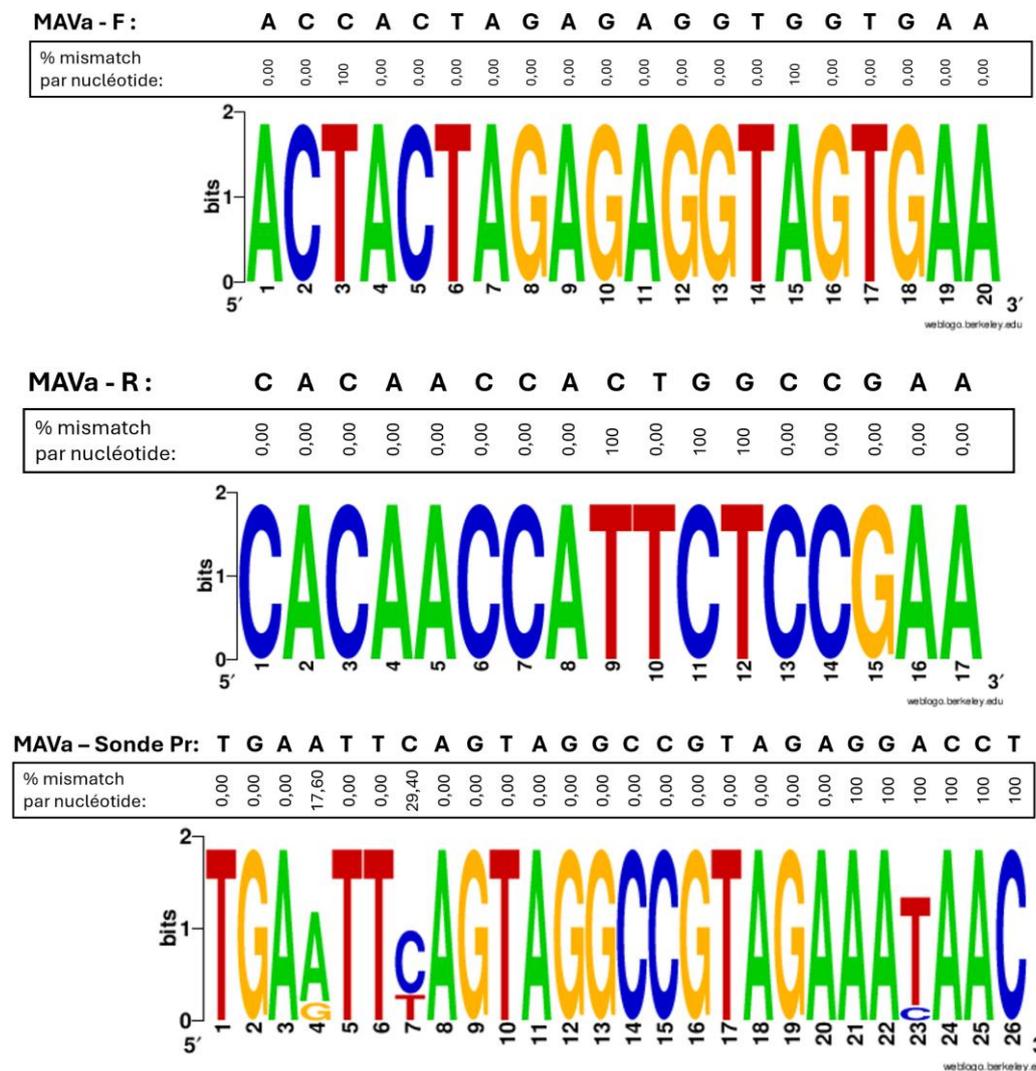


Figure 17: Exclusivité de la sonde et des amorces vis-à-vis des 17 séquences nucléotidiques du groupe MAVa sur base de leur séquence logo et pourcentage de mismatch par nucléotide

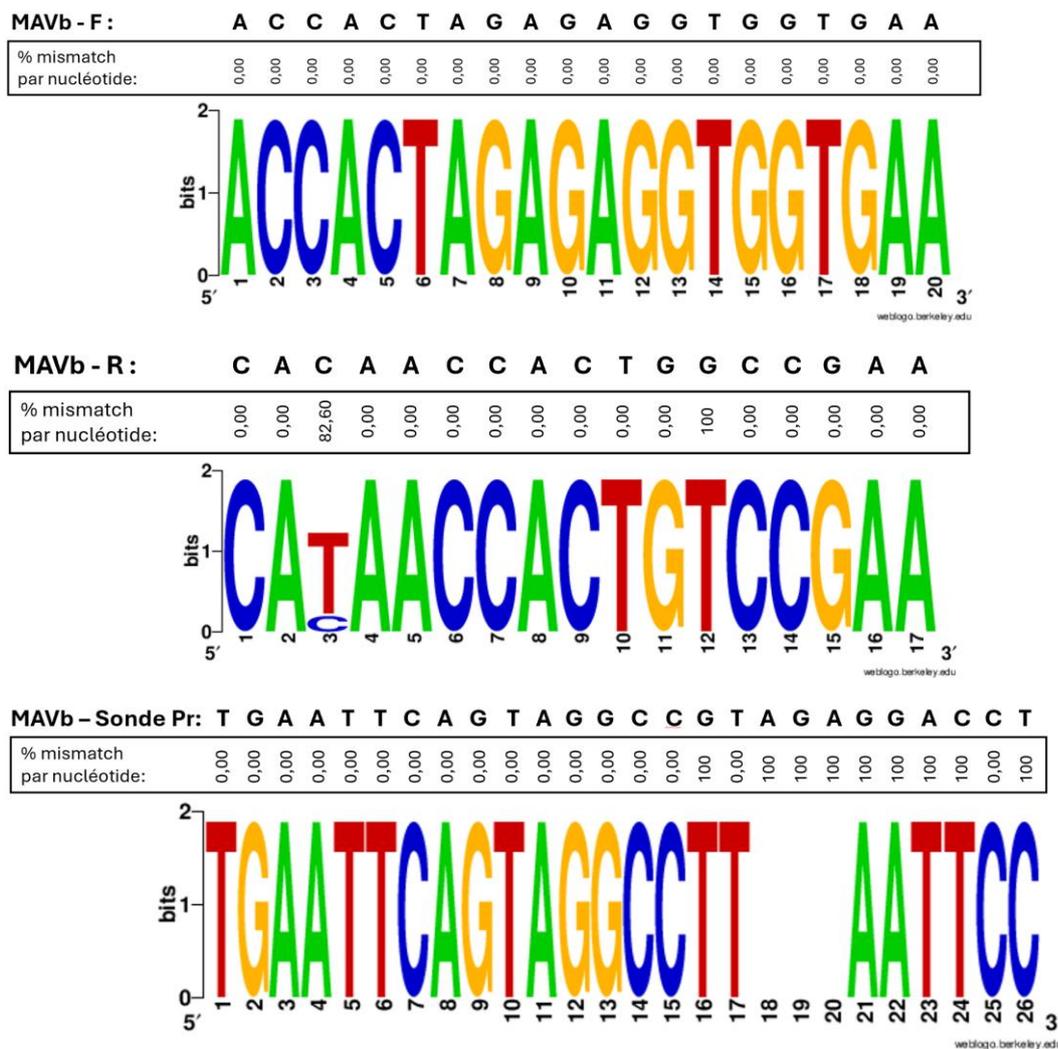


Figure 18 : Exclusivité de la sonde et des amorces vis-à-vis des 23 séquences nucléotidiques du groupe MAVb sur base de leur séquence logo et pourcentage de mismatch par nucléotide

Nombre de mismatch MAVa	0	1	2	6	7	8	9	11	12	13
Amorce PAV F	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0
Amorce PAV R	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0
Sonde PAV	0	0	0	0	12	2	3	0	0	0
PAV F + PAV R + PAV Sonde	0	0	0	0	0	0	0	12	2	3

Nombre de mismatch MAVb	0	1	2	9	10	11
Amorce PAV F	23	0	0	0	0	0
Amorce PAV R	0	4	19	0	0	0
Sonde PAV	0	0	0	23	0	0
PAV F + PAV R + PAV Sonde	0	0	0	0	4	19

Tableau 16 : Inclusivité des amorces et de la sonde pour les sous-groupes MAVa et MAVb, sur base du nombre de mismatch par sonde et amorce individuelle, ainsi que pour la combinaison des trois.

Ces tests *in silico* permettent de démontrer que les similitudes entre les amorces F et R et la sonde sont rares, et que le nombre cumulé de mismatches pour les deux amorces et la sonde varie entre 10 et 13 mismatches par séquence de nucléotides. De plus, l'extrémité 3' des séquences nucléotidiques sont dans 100% des cas incompatibles avec la sonde, et l'ensemble des 6 derniers nucléotides des séquences sont des mismatch

(sauf l'antépénultième nucléotide de des séquences MAVb). Sur base de cette analyse et des génomes disponibles dans la base de donnée, il est probable que la RT-qPCR ne permettra pas de détecter la présence BYDV-MAV, et que le test est exclusif à ces séquences.

BYDV-PAS

L'analyse in-silico a été réalisée avec les 31 séquences de BYDV-PAS.

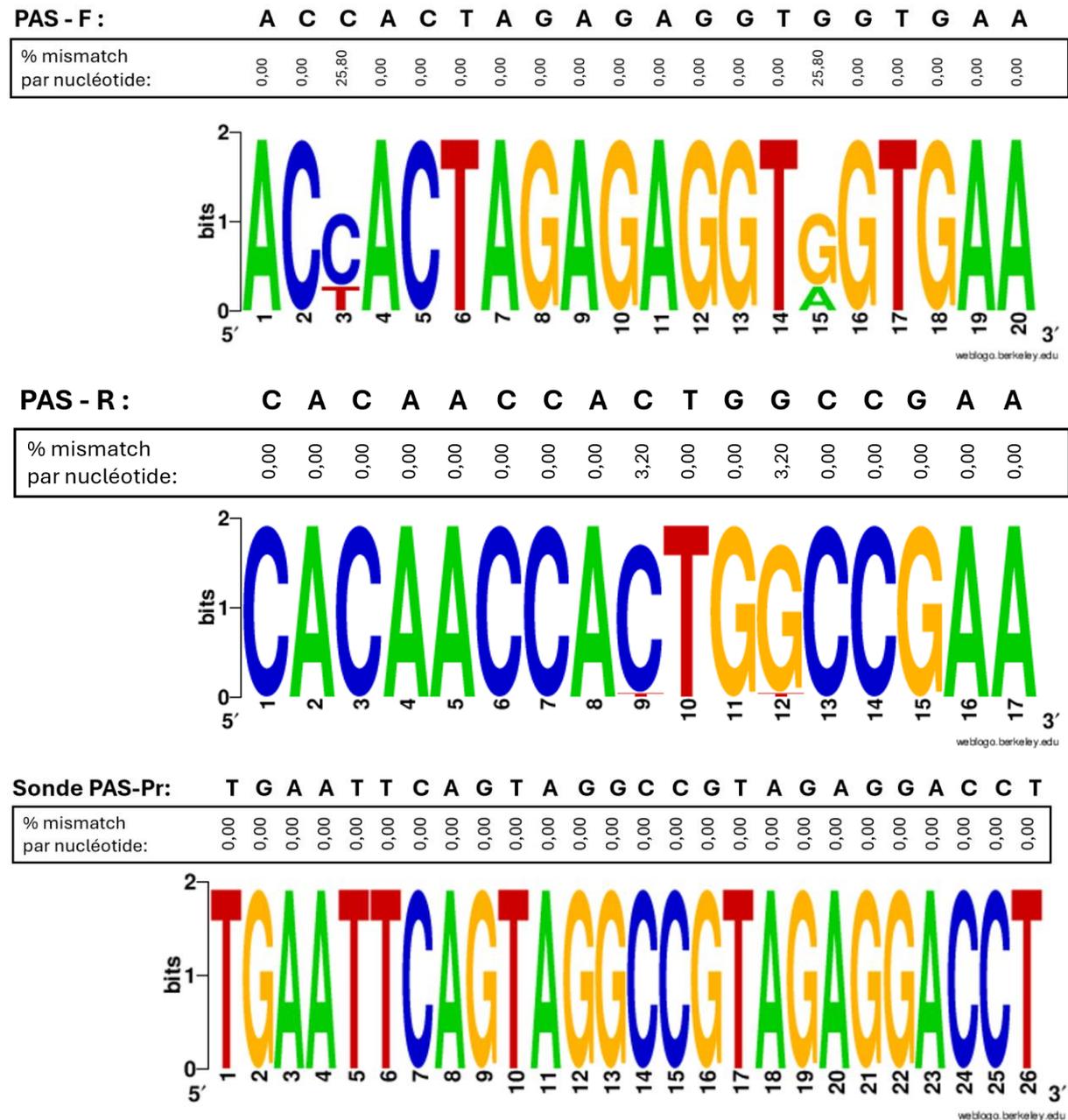


Figure 19 : Exclusivité de la sonde et des amorces vis-à-vis des 31 séquences nucléotidiques du BYDV-PAS sur base de leur séquence logo et pourcentage de mismatch par nucléotide

Nombre de mismatch PAS	0	1	2	3
Amorce PAV F	23	0	8	0
Amorce PAV R	30	0	1	0
Sonde PAV	0	0	0	0
PAV F + PAV R + PAV Sonde	22	0	9	0

Tableau 17: Inclusivité des amorces et de la sonde pour le BYDV-PAS, sur base du nombre de mismatch par sonde et amorce individuelle, ainsi que pour la combinaison des trois.

Ces séquences logo et le tableau des mismatch nous indique qu'il y a de fortes chances que notre sonde et nos amorces amplifient les séquences de type BYDV-PAS en plus des séquences BYDV-PAV.

L'exclusivité et l'inclusivité ont également été testées au laboratoire par un test RT-qPCR, avec un échantillon de PAV, MAV et PAS, avec 2 réplicats techniques par échantillon.

Echantillon	Ct 1er rép	Ct 2ème rép	Moyenne	Ecart-type	CoefVar
BYDV-PAV	15,43	15,53	15,48	0,07	0,46
BYDV-PAS	13,94	14,08	14,01	0,10	0,71
BYDV-MAV	35,17	35,23	35,20	0,04	0,12

Tableau 18: Valeurs Ct en RT-qPCR pour PAV, PAS et MAV.

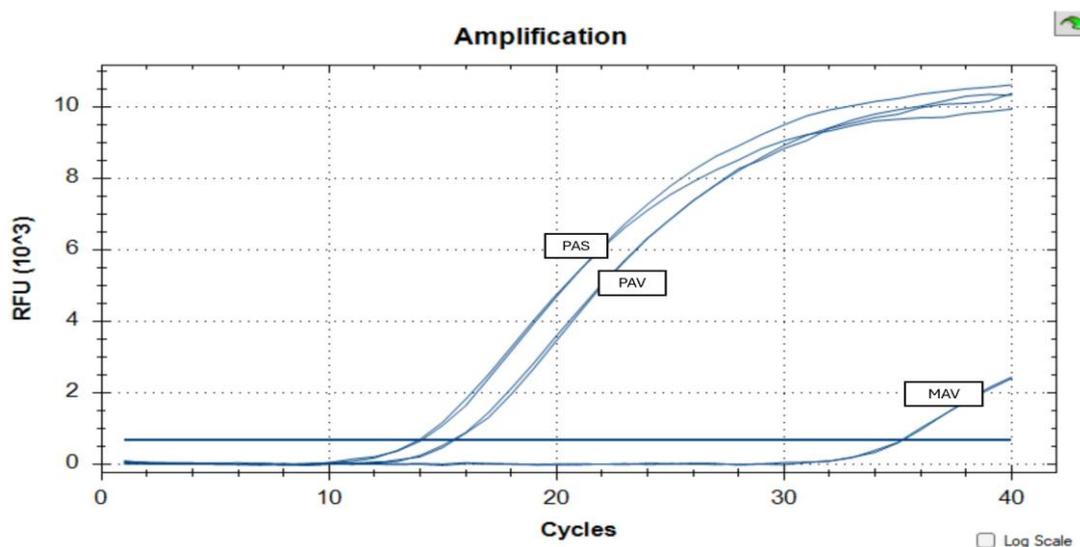


Figure 20 : Courbes d'amplification du test RTqPCR pour BYDV-PAV, BYDV-MAV et BYDV-PAS.

Ceci vient confirmer les analyses *in silico* du test MAV, car on remarque en effet que l'amplification de l'échantillon MAV n'a lieu qu'à partir de 35,20 Ct.

Toutefois, comme nous ne connaissons ni la concentration en BYDV-MAV de l'échantillon testé, ni celle des échantillons de puceron testés, nous ne pouvons pas affirmer un seuil de cut-off sur ce simple test. Cependant, nous pouvons affirmer que des résultats de Ct élevés (environ 35 Ct) devront être analysés avec précaution s'ils sont observés sur les échantillons.

Le fait que l'échantillon BYDV-PAS ai un Ct moyen de 14,01 signifie que ce test n'est pas exclusif vis-à-vis des échantillons positifs au PAS et confirme la non-exclusivité *in silico* pour BYDV-PAS.

3.2.4. Sélectivité

3.2.4.1. Pucerons ailés et aptères

Les résultats du test RT-qPCR concernant l'analyse du BYDV-PAV chez les pucerons ailés et aptères sont résumés dans le Tableau 19 et la Figure 21.

	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Variation
Ailés	26,60	3,09	11,60
Aptères	27,11	2,46	9,09

Tableau 19 : Analyse de la sélectivité par RT-qPCR des pucerons ailés et aptères (10 réplicats biologiques, 1 réplicat technique)

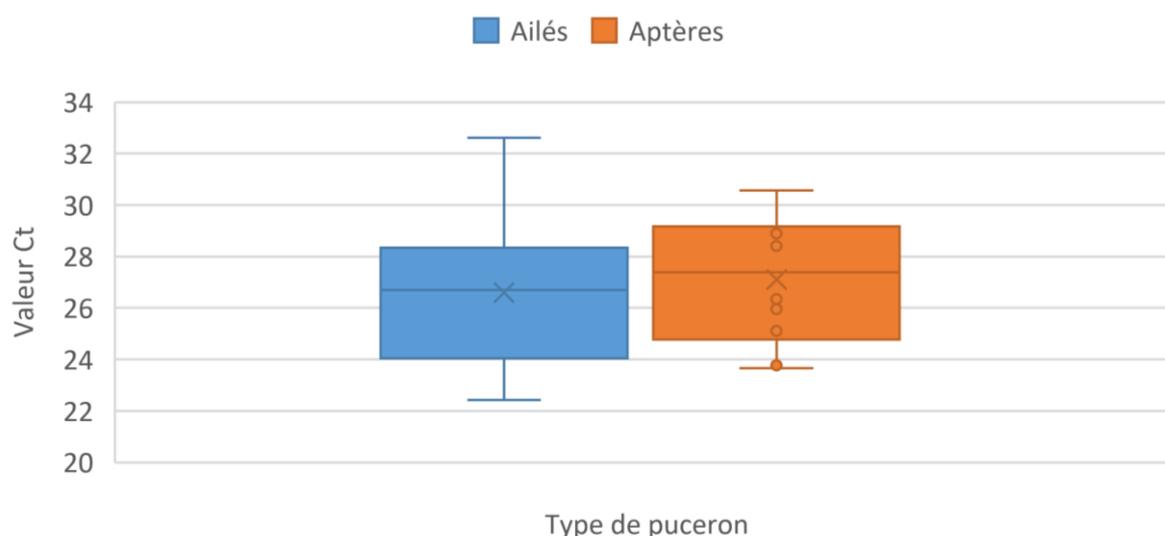


Figure 21 : Diagramme Boxplot des Ct de pucerons ailés et aptères

Les résultats de l'ANOVA ont montré une statistique F de 0,17 avec 1 et 18 degrés de liberté ($F[1, 18] = 0,17$). La p-value associée était de 0,69

Étant donné un seuil de signification (α) fixé à 0,05, cette p-value (0,6855) est supérieure à α . Par conséquent, nous ne rejetons pas l'hypothèse nulle, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes obtenues pour les 2 types de pucerons. Les résultats sous forme graphique sont disponibles à l'annexe 3.

3.2.4.2. Matrices de dilution

Les résultats de la sélectivité du test RT-qPCR montrent une différence entre les Ct en fonction de la matrice de dilution (*R. padi*, *S. avenae* et *M. persicae*). Le tableau 20 est un récapitulatif des différentes dilutions des trois réplicats biologiques dans les différentes matrices de pucerons.

Dilution 0x	Puceron 1			Puceron 2			Puceron 3		
	R. padi	S. avenae	M. persicae	R. padi	S. avenae	M. persicae	R. padi	S. avenae	M. persicae
Dilution 10x	32,49	34,04	30,93	34,32	32,01	31,37	33,02	32,19	31,45
Dilution 100x	38,92	38,29	33,92	38,65	34,41	33,49	36,72	35,78	34,44
Dilution 1000x	NA	NA	39,24	NA	39,03	37,88	38,98	NA	36,58

Tableau 20 : Analyse de la sélectivité par la dilution de *R. padi* positif au BYDV-PAV dans matrices de *R. padi*, *S. avenae* et *M. persicae* sains (3 réplicats biologiques et 1 réplicat technique)

Les résultats de la RT-qPCR montrent que la matrice de dilution a une influence sur le Ct lors de la dilution du puceron 10x, 100x et 1000x. Les pentes des courbes standards sont une mesure directe de l'efficacité de la PCR. Les meilleures matrices de dilution sont la matrice *M. persicae* (3,33 Ct/Log10(dilution)) et la matrice *S. avenae* (3,14 Ct/log10(dilution)). Ces 2 pentes de courbes standards sont comprises entre 3,6 et 3,1, ce qui valide l'efficacité de l'amplification (cf. 2.4.1.1) pour ces matrices. Toutefois, la courbe standard pour la dilution dans du *R. padi* (2,85 Ct/log10(dilution)) ne valide pas la bonne efficacité des de l'amplification dans cette matrice.

3.2.5. Répétabilité

Afin d'évaluer la répétabilité technique du test, 5 pucerons (réplicats biologiques) ont été préparés individuellement et dilués x1000 dans du jus de *R. padi* sain, et 8 puits par puceron (réplicats techniques) ont été testés en RT-qPCR.

Les résultats de ce test de répétabilité sont présentés ci-dessous :

Réplicat	Valeur Ct Dil 0x	1	2	3	4	5	6	7	8	Moyenne Ct	Ecart type Ct	Coef Var
Puceron 1	23,85	31,69	31,67	30,97	31,13	31,04	31,49	31,57	31,86	31,43	0,34	1,07
Puceron 2	31,09	33,97	33,86	33,35	34,12	33,66	33,36	33,71	33,57	33,70	0,28	0,82
Puceron 3	22,09	31,09	31,37	30,96	31,03	30,9	30,83	30,97	31,18	31,04	0,17	0,55
Puceron 4	27,99	34,56	35,04	34,39	34,51	34,41	34,81	34,41	34,42	34,57	0,24	0,68
Puceron 5	24,86	33,37	33,17	33,06	33,29	33,03	33,06	33,08	32,99	33,13	0,13	0,41

Tableau 21 : Analyse de la répétabilité technique et biologique du test RT-qPCR, valeurs de Ct obtenus pour les 5 pucerons testés en 8 réplicats techniques, moyenne des Ct, Écart type Ct et Coefficient de Variation des Ct.

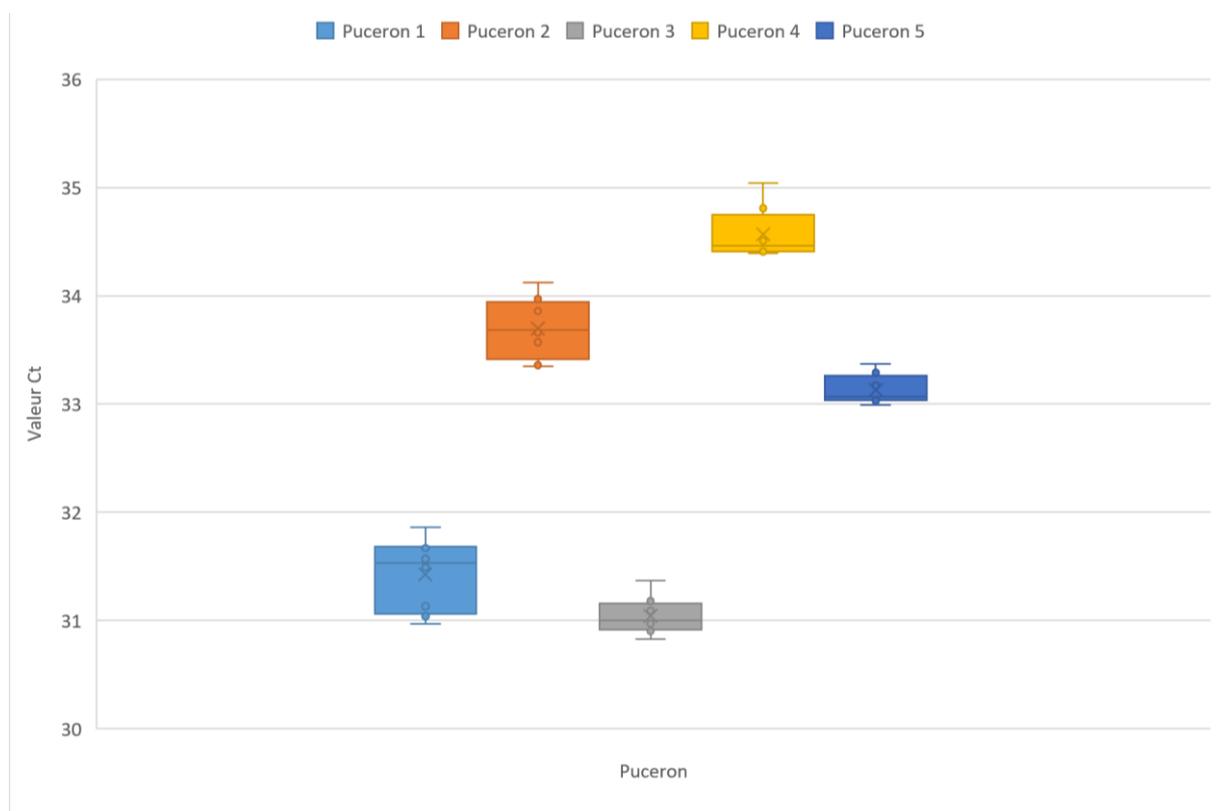


Figure 22 : Diagramme boxplot pour l'analyse de la répétabilité technique et biologique des Ct pour la détection du BYDV-PAV chez 5 pucerons.

Le diagramme boîte à moustaches indique que chaque puceron testé a une charge virale initiale intrinsèque, comprise entre 30,83 et 35,04 pour une dilution 1000x des *R. padi* positifs dans du jus de puceron négatif. Il existe une faible variation de Ct pour chaque réplicat technique d'un même puceron, avec l'écart-type maximal étant de 0,34. Ces résultats montrent une bonne répétabilité biologique et technique du test RT-qPCR.

3.2.6. Reproductibilité

La reproductibilité a été testée en reprenant les résultats du test de sensibilité analytique (*R. padi* positif au BYDV dilué 0x, 10x, 100x, 1000x et 10000x dans du *R. padi* sain, 5 réplicats techniques) et en réalisant l'expérience à nouveau par un autre opérateur.

L'ensemble des données a été intégré dans le Tableau 22.

Résultats Opérateur 1	Puceron 1	Puceron 2	Puceron 3	Puceron 4	Puceron 5	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Var
Dil 0	25,12	22,70	22,18	23,12	25,13	23,65	1,39	5,86
Dil 10	27,01	27,57	26,51	27,41	28,1	27,32	0,60	2,19
Dil 100	30,33	30,95	29,88	30,75	31,53	30,69	0,62	2,04
Dil 1000	33,81	33,90	33,26	34,33	34,57	33,97	0,51	1,49
Dil 10000	37,31	38,26	33,24	37,54	38,45	36,96	2,13	5,77

Résultats Opérateur 2	Puceron 1	Puceron 2	Puceron 3	Puceron 4	Puceron 5	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Var
Dil 0	23,54	21,54	23,73	24,54	24,5	23,57	1,22	5,18
Dil 10	27,48	25,36	27,06	28,57	27,42	27,18	1,16	4,28
Dil 100	29,95	29,05	30,45	31,88	30,81	30,43	1,05	3,44
Dil 1000	33,29	32,42	33,67	35,5	34,37	33,85	1,16	3,43
Dil 10000	37,31	35,37	36,61	38,41	36,97	36,93	1,10	2,99

Tableau 22 : Valeurs des Ct pour les dilutions de 0x à 10000x pour 2 opérateurs différents, avec 5 réplicats biologiques par opérateur. Les résultats de l'opérateur 1 ont déjà été présentés pour la sensibilité du test et sont ici à titre indicatif.

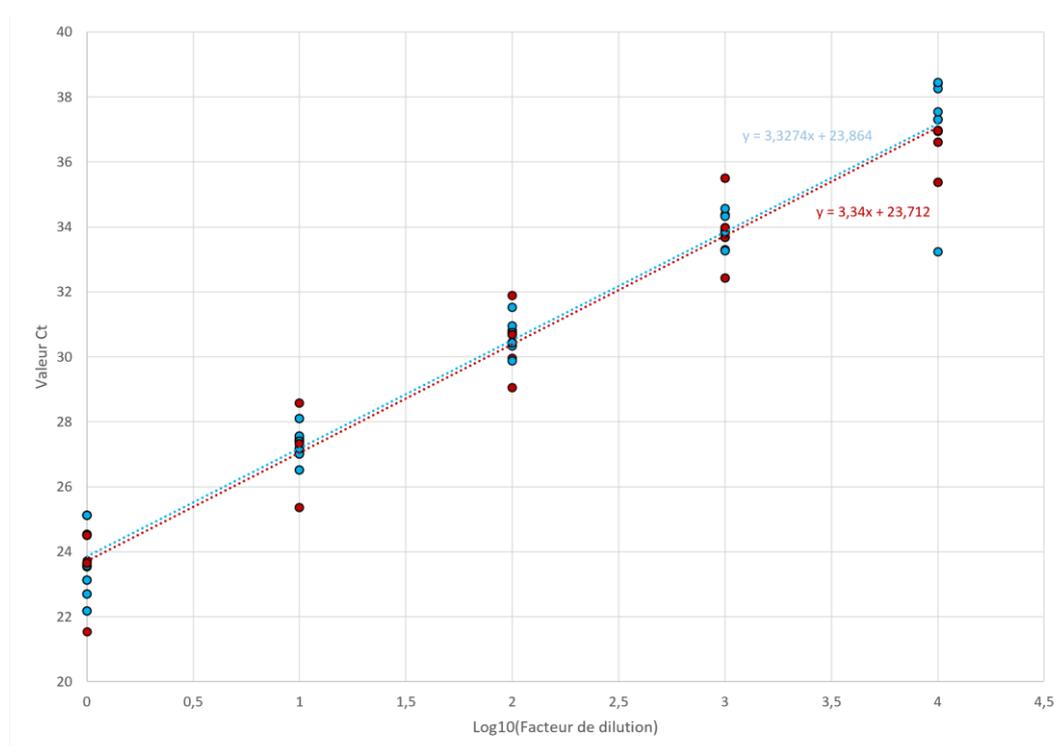


Figure 23 : Analyse de la reproductibilité du test RT-qPCR en BYDV-PAV par comparaison inter-opérateur (5 réplicats biologiques). Les points rouges sont la série réalisée par l'opérateur 1, et les points en bleu celle réalisée par l'opérateur 2.

Grâce au graphique précédent, nous pouvons noter la linéarité des points (avec $R^2(\text{série 1})=0,9994$ et $R^2(\text{série 2})= 0,9986$ tous deux proches de 1). Les pentes ont une ordonnée à l'origine très proches (23,71 pour l'opérateur 1 et 23,86 pour l'opérateur 2), et un coefficient proche (3,34 pour l'opérateur 1 et 3,33 pour l'opérateur 2), ce qui implique une bonne reproductibilité du test.

3.3. Tests d'optimisation de l'analyse RT-qPCR

3.3.1. Test méthode de conservation

La méthode de conservation des pucerons a été testée afin de voir si les différences entre les temps de conservation des pucerons dans le liquide savonneux de la tour à suction ont une influence sur le caractère positif au BYDV-PAV et sur la valeur du Ct détectée en RT-qPCR. Les résultats du test se trouvent dans le tableau 23 et le graphe 24.

Méthode conservation	% positif	Moyenne Ct	Ecart-type Ct	Coef Variation	Ct max	Ct min
3 jours	100,00	28,45	2,44	8,56	33,36	25,45
1 jour	93,33	26,73	2,46	9,22	31,55	24,03
2 min	100,00	26,65	3,14	11,79	33,04	22,37

Tableau 23 : Récapitulatif des différentes méthodes de conservation des pucerons et de leurs valeurs de Ct pour chaque méthode.

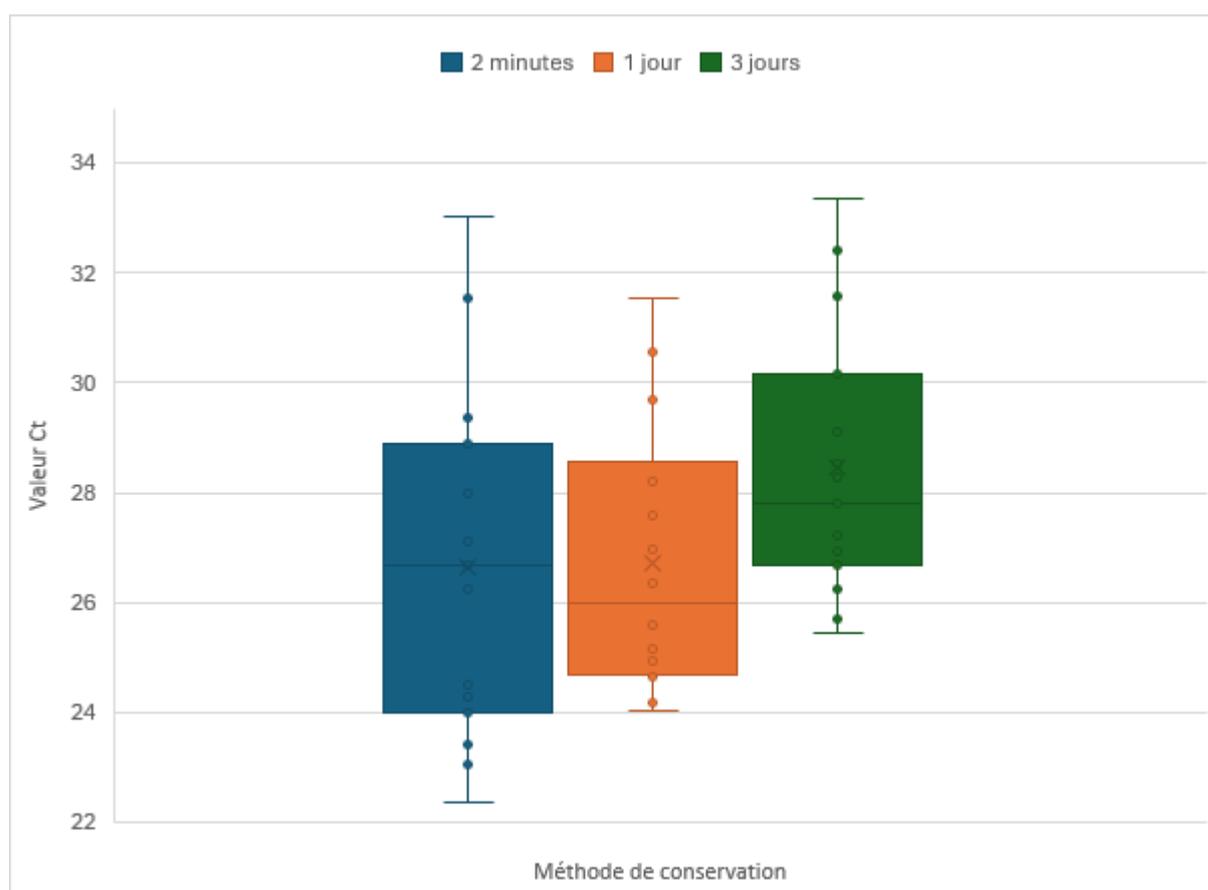


Figure 24 : Diagramme boxplot des valeurs de Ct obtenues pour différents temps de conservation des pucerons dans le liquide de piégeage (15 réplicats biologiques, un réplicat technique)

L'un des dix échantillons de pucerons prélevés de la colonie virulifère s'est révélé négatif pour le BYDV-PAV après 1 jour dans le tampon. Ce résultat peut s'expliquer par l'hétérogénéité de la charge virale au sein d'une même colonie de pucerons, où la présence du virus n'est pas garantie chez chaque individu.

Une tendance à l'augmentation des valeurs de Ct a été observée en fonction du temps de conservation, ce qui suggère une dégradation progressive de l'ARN viral. Cette tendance est particulièrement visible en comparant les valeurs de Ct minimales: le Ct minimum pour un temps de conservation de 2 minutes était de 22,37, tandis que celui pour une conservation de 3 jours s'élevait à 25,45.

Afin d'évaluer l'impact du temps de conservation des pucerons dans le liquide de capture sur les valeurs de Ct du test RT-qPCR BYDV-PAV, une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée.

Les résultats de l'ANOVA ont montré une statistique F de 2,11 avec 2 et 41 degrés de liberté ($F[2,41]=[2,11]$). La p-value associée était de 0,1337.

Étant donné un seuil de signification (α) fixé à 0,05, cette p-value (0,13367) est supérieure à α . Par conséquent, nous ne rejetons pas l'hypothèse nulle, et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

3.3.2. Test contamination croisée

Ce test visait à évaluer le risque de contamination croisée en déterminant si la présence de pucerons sains et virulifères dans un même récipient de collecte influençait la détection du BYDV-PAV et son seuil de détection.

Le tableau 24 reprend les valeurs de Ct du test de cross-contamination.

	Résultats Pos/Neg	Moy Ct pucerons positifs	Ecart type Ct	Coef Variation	Ech avec Ct/sans Ct	Moy Ct tardifs	Ecart type Ct	Coef Variation
9 positifs + 1 négatif 1	9 / 1	27,36	2,30	8,42	9/1	-	-	-
9 positifs + 1 négatif 2	9 / 1	26,59	1,46	5,49	10/0	35,14	-	-
9 positifs + 1 négatif 3	9 / 1	26,57	1,57	5,90	10/0	38,1	-	-
5 positifs + 5 négatifs 1	5 / 5	26,98	2,78	10,29	5/5	-	-	-
5 positifs + 5 négatifs 2	5 / 5	25,63	2,89	11,27	3/7	39,11	0,45	1,15
5 positifs + 5 négatifs 3	5 / 5	26,69	2,56	9,61	5/5	-	-	-
1 positif + 9 négatifs 1	1 / 9	27,58	-	-	6/4	37,63	1,15	3,05
1 positif + 9 négatifs 2	1 / 9	23,43	-	-	7/3	38,67	0,12	0,31
1 positif + 9 négatifs 3	1 / 9	26,86	-	-	5/5	38,84	0,94	2,41

Tableau 24 : Analyse de l'influence de la conservation de pucerons positifs et négatifs dans le même liquide de conservation.

Les résultats obtenus indiquent que le co-stockage de pucerons positifs et négatifs n'a pas d'influence sur la détection de BYDV-PAV, étant donné que les mêmes ratios (9/1,5/5 et 1/9) sont détectés lors de la RT-qPCR.

3.4. RT-qPCR pucerons Automne 2024

La figure 25 présente les résultats des pucerons capturés, ainsi que la quantité de pucerons positifs au BYDV, par espèce et par journée de capture.

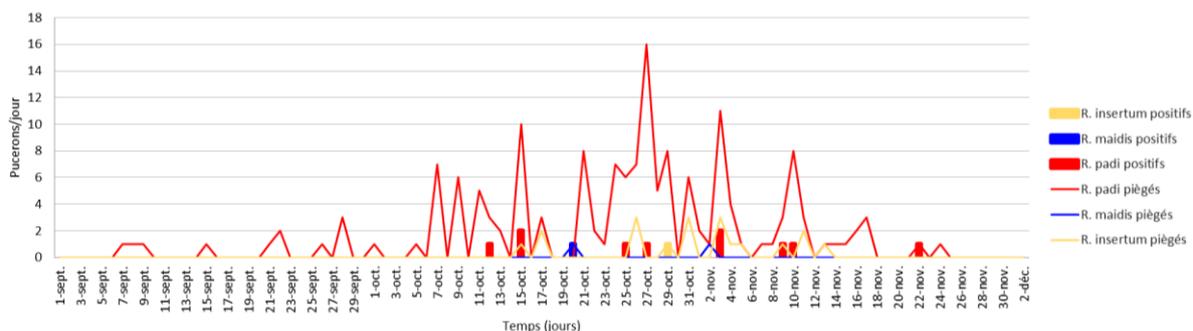


Fig. 25 : Distribution quotidienne des différentes espèces de pucerons capturées par la tour à succion du CRA-W de Gembloux, et le nombre de pucerons positifs par espèce.

Sur l'automne 2024 (1^{er} septembre au 1^{er} décembre 2024), un ensemble de 181 individus des 3 espèces de pucerons (19 *R. insertum*, 2 *R. maidis* et 160 *R. padi*) ont été capturés par la RTS suction trap du CRA-W de Gembloux. On observe un taux de capture plus élevé à partir du 7 Octobre jusqu'au 10 Novembre.

Au total, 12 pucerons sont positifs au BYDV-PAV (1 *R. insertum*, 1 *R. maidis* et 10 *R. padi*), soit un taux de 6,6% de pucerons capturés positifs. L'intégralité des pucerons positifs au BYDV ont été capturés entre le 12 Octobre et le 10 Novembre (sur 134 pucerons piégés sur cette période-ci). La moyenne des Ct des 12 pucerons positifs est de 29,12, l'écart-type est de 3,93. Le Ct minimal est de 21,05 et le Ct maximal est de 34,86.

Neuf pucerons piégés ont un Ct tardif non considéré (supérieur à 35), dont la moyenne est de 38,95 et l'écart-type est de 0,82. Le Ct minimal est de 37,05.

L'intervalle de capture de pucerons positifs correspond à l'intervalle où le taux de capture de pucerons est le plus élevé (7 Octobre - 10 Novembre).

L'espèce de puceron majoritaire dans la capture est le *R. padi*, représentant 88,4% des pucerons capturés. Parmi ceux-ci, 10 pucerons ont été testés positifs au BYDV-PAV, soit une prévalence de 6,3%.

Aucun individu des espèces *S. avenae* et *M. dirhodum*, bien que ciblées, n'a été capturé au cours des trois mois d'échantillonnage.

4. Discussion

L'objectif de cette étude est de contribuer à un meilleur suivi de l'épidémiologie des YDVs afin d'optimiser le timing d'application des produits phytopharmaceutiques (PPP).

4.1. Évaluation des méthodes de détection des virus

4.1.1. DAS-ELISA : Avantages et limites

Les analyses DAS-ELISA ont permis de confirmer la présence et la prévalence du BYDV-PAV dans les parcelles d'orge échantillonnées en Wallonie, ce qui est cohérent avec les résultats déjà observés dans d'autres régions européennes (Henry et Derdryver, 1991 ; Henry et al., 1993 ; Lemaire et al., 2018 ; McNamara et al., 2020, Byrne et al., 2024). Cette méthode, largement utilisée pour la quantification virale dans les tissus végétaux (Foster et al., 2004 ; Fabre et al., 2003 ; Lister et Rochow, 1979), présente néanmoins des limites majeures pour la détection fiable des espèces BYDV-MAV et CYDV-RPV.

Malgré l'utilisation de nouveaux anticorps et la répétition des tests, les témoins positifs MAV et RPV sont restés négatifs, suggérant un problème d'activité des anticorps ou de compatibilité du protocole, ou bien un problème de témoins positifs. Par ailleurs, une réactivité croisée entre espèces virales, notamment entre BYDV-PAS et BYDV-PAV, a été rapportée (Jarosova et al., 2013), ce qui complique la discrimination précise des espèces par ELISA.

4.1.2. RT-qPCR : performances et spécificité

En comparaison, la RT-qPCR développée selon les standards EPPO 7/98 (5), s'est avérée être une méthode nettement plus efficace en termes de détection de BYDV-PAV-like, c'est-à-dire qui détecte toutes les souches BYDV-PAV et de BYDV-PAS (Jarosova et al., 2013), notamment chez les pucerons.

Les paramètres de validation indiquent une efficacité d'amplification, avec une pente de 3,33 (très proche de la valeur idéale, de 3,32) lors du test de sensibilité, et une inclusivité élevée, avec 87,84% des 148 séquences testées en BYDV-PAV sans mismatch et seulement 3 séquences sur les 148 ont un mismatch sur les 5 derniers nucléotides en 3' pour la sonde et les amorces. L'exclusivité du test vis-à-vis du BYDV-MAV a été confirmée, tant *in silico* (l'ensemble des séquences BYDV-MAV ont de multiples mismatches et 100% d'incompatibilité avec au moins 4 des 5 nucléotides de l'extrémité 3' de la sonde, quel que soit le groupe (MAVa ou MAVb)) que *in vitro* (amplification tardive >35 Ct pour le BYDV-MAV). Cela sous-entend que l'exclusivité en MAV est conférée par la Sonde-PAV-Pr. Toutefois, ces résultats encouragent à interpréter avec discernement les échantillons dont le Ct est supérieur à 35 (Ct tardif), afin d'éviter de détecter des espèces de BYDV-MAV. Cependant, les résultats de l'exclusivité ont montré que le test n'est pas exclusif au BYDV-PAS, avec un Ct moyen de 14,01 pour le test *in vitro*. L'analyse *in silico* vient

confirmer cette information, avec un taux de mismatch avec la sonde et les amorces très faible.

Cela suggère que les résultats de détection de BYDV-PAV-like dans nos échantillons de terrain pourraient en réalité inclure une proportion indéterminée de BYDV-PAS, limitant la spécificité de la quantification pour le seul BYDV-PAV. Pour une discrimination future plus fine entre BYDV-PAV et BYDV-PAS, des méthodes complémentaires telles que la droplet digital PCR ou le séquençage seraient nécessaires (Ballandras et al., 2024 ; Byrne et al., 2024).

La sélectivité du test RT-qPCR a montré que la matrice de dilution influence le Ct et, par conséquent, l'efficacité d'amplification. La matrice de *M. persicae* a montré la plus faible inhibition, suivie de *S. avenae*, et enfin *R. padi*. Cette dernière observation est cruciale, car elle implique que la charge virale réelle pourrait être sous-estimée lorsque des pucerons positifs sont dilués dans du jus de *R. padi* sain, notamment lorsque le puceron testé a une charge virale initiale faible, il pourrait être considéré comme étant faux négatif. Le test de sélectivité concernant les pucerons ailés et aptères n'indique pas de différence significative entre les 2 morphotypes de pucerons.

Le test a montré une bonne cohérence dans les résultats des répétitions techniques et biologiques (faibles variations entre les différents réplicats), ainsi qu'une bonne reproductibilité, ce qui est en adéquation avec les normes de validation EPPO.

Les tests d'optimisation ont apporté des éclaircissements sur les conditions de manipulation des échantillons. Bien qu'une tendance à la dégradation de l'ARN viral ait été observée avec un temps de conservation prolongé dans le liquide de capture des pucerons (augmentation des valeurs de Ct minimales), cette différence n'était pas statistiquement significative. De manière similaire, Borgolte et al. (2024) ont noté une dégradation de l'ARN viral dans les pucerons incubés dans le liquide des pièges après 7 jours lors de leur test de conservation des pucerons, se traduisant également par des valeurs de Ct plus élevées, mais que la sensibilité de leur essai restait suffisante pour la détection. De plus, l'étude de Bates et al. (2020), qui étudie la viabilité et pertinence d'une détection de BYDV-PAV par RT-PCR sur les pucerons capturés par pièges jaunes collants, indique que le procédé de piégeage, extraction et de conservation au froid n'a pas d'influence sur la détectabilité du virus entre 0 et 3 jours, mais que la détectabilité chutait significativement après 3 jours et 7 jours de conservation sur le piège. Ces deux études viennent étayer les résultats de notre test de conservation des pucerons, et cela implique qu'une collecte régulière des pucerons capturés par la tour à succion est nécessaire à la bonne détection du BYDV-PAV dans les pucerons capturés.

De plus, l'étude sur la contamination croisée a démontré que le co-stockage de pucerons positifs et négatifs dans le même récipient ne conduit pas à une détection de BYDV-PAV dans les pucerons initialement négatifs. Ces résultats sont favorables pour la logistique d'échantillonnage, validant le protocole de piégeage et de conservation des pucerons.

4.2. Prévalences et implications épidémiologiques

4.2.1. Prévalence des YDVs dans les parcelles Wallonnes

Les données initiales sur la prévalence du BYDV-PAV et BYDV-MAV dans les parcelles d'orge échantillonnées en Wallonie sont intéressantes, bien que limitées à une seule saison de collecte pour les plantes. Les parcelles échantillonnées ont une prévalence comprise entre 0 et 86% en BYDV-PAV, et entre 2 et 28% en BYDV-MAV (sur base de l'interprétation des résultats d'échantillons positifs en BYDV-MAV et négatifs en BYDV-PAV). Les parcelles de la région du Hainaut ont une prévalence en BYDV-PAV et BYDV-MAV supérieure aux restes des parcelles de la Wallonie. Ceci rentre en cohérence avec la variabilité de la prévalence et de l'incidence des espèces de YDV à l'échelle mondiale. Par exemple, le BYDV-MAV est dominant en Irlande en raison de l'abondance de *S. avenae* et de la faible présence de maïs comme hôte alternatif (Byrne et al., 2024), tandis que le BYDV-PAS est prédominant en République tchèque (Jarosova et al., 2013). En France, le BYDV-PAV et le BYDV-MAV sont largement distribués, et le BYDV-PAV est le plus commun dans l'ouest de la France (Henry et Derdryver, 1991). Le BYDV-MAV est plus associé aux sites plus au nord, tandis que les isolats de BYDV-PAV étaient plus fréquents plus au sud (Henry et al., 1993). En Europe de l'Ouest, le BYDV-PAV, le BYDV-MAV et le CYDV-RPV sont les espèces les plus courantes signalées (McNamara et al., 2020).

4.2.2. Prévalence des pucerons piégés

L'échantillonnage de pucerons effectué à l'automne 2024 par la tour à succion de Gembloux a permis de détecter le BYDV-PAV chez 12 pucerons sur 181 analysés, incluant les espèces *R. padi*, *R. maidis* et *R. insertum*. *R. padi* est reconnu comme le vecteur le plus efficace du BYDV-PAV, tandis que *R. maidis* est reconnu pour être le vecteur le plus efficace du CYDV-RMV (Van den Eynde et al., 2020). *R. padi* constitue 88,40% des pucerons collectés sur la période de piégeage. Ceci semble être une tendance normale, avec *R. padi* constituant presque à lui seul le pic des saisons automnales en climat tempérés (A'Brook, 1974). On notera également l'absence de piégeage de *Metopolophium dirhodum* et *Schizaphis graminum*, mentionnés comme des espèces de pucerons vectrices des YDVs dans les régions au climat tempérés par Van den Eynde et al. (2020), qui peut résulter d'un problème lors du tri des pucerons, ou d'une donnée particulière à l'automne 2024.

4.2.3. Prévalence pucerons positifs au BYDV

La proportion de pucerons virulifères sur l'ensemble des pucerons piégés est de 6,6%. Pour le *R. padi*, cette proportion représente 6,3% de pucerons vecteurs du BYDV-PAV. L'échantillonnage pour *R. maidis* et *R. insertum* est trop faible pour déterminer un pourcentage de pucerons vecteurs de virus par espèce.

Ces proportions se situent dans des ordres de grandeur pertinents pour les modèles prédictifs, comme celui du BYDV PREDICTOR en Australie qui estime à 5% la proportion de pucerons virulifères immigrantes (Thackray et al., 2009), ou le seuil maximal de 11,5% lors d'une étude menée dans la comté de Hutfordshire (Plumb, 1976).

4.3. Limites de l'étude et perspectives futures

4.3.1. Echantillonnage, méthodes de détection et ensemble de données

Les échantillons de pucerons proviennent d'une unique tour à succion à Gembloux, et les plants d'orge de 17 parcelles réparties en Wallonie. Une extension de l'échantillonnage des pucerons et des plantes à l'échelle régionale est nécessaire pour obtenir une image plus représentative de l'épidémiologie des YDV en Wallonie. De plus, les pucerons capturés par la tour à succion du CRA-W ne sont pas représentatifs de l'ensemble des vols de pucerons de la Wallonie. Des échantillonnages de pucerons pourraient être réalisés par l'utilisation de *water pan traps* comme utilisés dans l'étude de Borgolte et al. (2024), ou des pièges jaunes collants, comme pour l'étude menée par Bates et al. (2020). Toutefois, ce type d'échantillonnage s'avère être plus coûteux en termes de main d'œuvre et en déplacement que l'échantillonnage par tour à succion.

La détection du BYDV-MAV dans les champs est basée sur une tentative d'interférence face à l'incapacité de la méthode à fournir des résultats fiables pour ces espèces, et des analyses moléculaires plus poussées, telles que la RT-PCR ou RT-qPCR, pourraient être réalisées pour connaître réellement la prévalence de BYDV-MAV dans ces échantillons, en designant des amorces et une sonde spécifique pour cette espèce. De plus, le test ELISA ne s'étend qu'aux espèces pour lesquelles des anticorps sont disponibles, ce qui limite l'étendue de l'étude.

Les tests pour la validation et vérification de la RT-qPCR, notamment l'analyse de la sensibilité, les tests de sélectivité des pucerons ailés et aptères, de répétabilité, de reproductibilité et de stabilité, et le test de conservation des pucerons, ont chacun été réalisés sur une seule plaque par test RT-qPCR. Afin de s'assurer d'obtenir des bons résultats, il faudrait idéalement répliquer chaque test, et faire regarder s'il existe des différences significatives entre les tests.

La forte réactivité du test *in silico* RT-qPCR avec le BYDV-PAS et le test d'exclusivité quant à cette espèce implique que les données quantitatives de "BYDV-PAV" pourraient en fait refléter la présence des deux espèces. Pour des prévisions précises, une méthode capable de les discriminer, telle que la droplet digital PCR (Ballandras et al., 2024), serait préférable afin d'identifier les espèces exactes et leurs proportions. Ce caractère BYDV-PAV-like du test RT-qPCR pourrait également être amélioré, en appliquant d'autres méthodes d'analyse, telles que celles proposées dans les études de Malmstrom et Shu (2004), de Deb et Anderson (2008) et de Jarosova et al. (2018), suggérant l'utilisation de méthodes d'analyse par Multiplex RT-PCR et par TaqMan Multiplex Real-Time qPCR. Ces

pistes de recherche sont intéressantes pour les perspectives futures, afin d'augmenter la spécificité de notre test, et ainsi distinguer précisément et efficacement les espèces différentes espèces de YDVs

La modélisation prédictive de la gravité des épidémies de YDV nécessite des données sur plusieurs années pour être fiable et robuste. Les dynamiques des populations de pucerons et des virus sont fortement influencées par les conditions climatiques annuelles (température, précipitations) et la composition du paysage agricole. Le jeu de données obtenu à travers cette étude n'est que mono-annuel et n'est pas suffisant pour en tirer des conclusions. On pourrait envisager de tester des séries historiques, si leur méthode de conservation n'influence pas la détection de BYDV-PAV.

Une autre perspective serait le développement d'une modélisation éco-épidémiologique intégrée, en couplant les données virologiques, climatiques, composition paysagère et densité d'hôtes alternatifs dans un modèle prédictif dynamique, à l'image du BYDV Predictor australien (Thackray et al., 2009), afin d'améliorer la prévision du risque épidémique.

5. Conclusion

En conclusion, notre travail confirme l'efficacité de la RT-qPCR comme outil de diagnostic privilégié et validé pour la surveillance des YDVs chez les pucerons vecteurs. La capacité à détecter de faibles proportions de pucerons virulifères avec une méthode sensible et reproductible ouvre la voie à des systèmes d'alerte précoce plus robustes, essentiels dans un contexte de réduction des intrants chimiques. Les prochaines étapes essentielles seront de collecter des données sur plusieurs années ou d'analyser des jeux de données historiques, d'étendre l'échantillonnage de plantes mais surtout l'échantillonnage de pucerons soit par l'utilisation d'autres méthodes de piégeage afin d'obtenir une représentation plus large des populations de pucerons sur le territoire Wallon, et de développer des méthodes permettant une discrimination plus fine des espèces virales (par exemple, la RT-qPCR multiplex ou la PCR digitale en gouttelettes). L'intégration de ces données virologiques avec des facteurs environnementaux, comme le climat et le paysage, dans des modèles éco-épidémiologiques pourrait alors permettre d'optimiser le timing, la quantité et l'application des interventions phytosanitaires et de contribuer à une gestion plus durable et éclairée des YDVs dans les céréales.

6. Contributions personnelles de l'étudiant

J'ai mené toutes les étapes et analyses mentionnées dans cette étude, sauf celles que je n'ai pas pu réaliser à cause d'un bras dans le plâtre (notamment les extractions de plantes), ainsi que celles qui nécessitaient l'implication d'une autre personne (comme le test de reproductibilité).

7. Annexes

Advanced options

Gap opening penalty

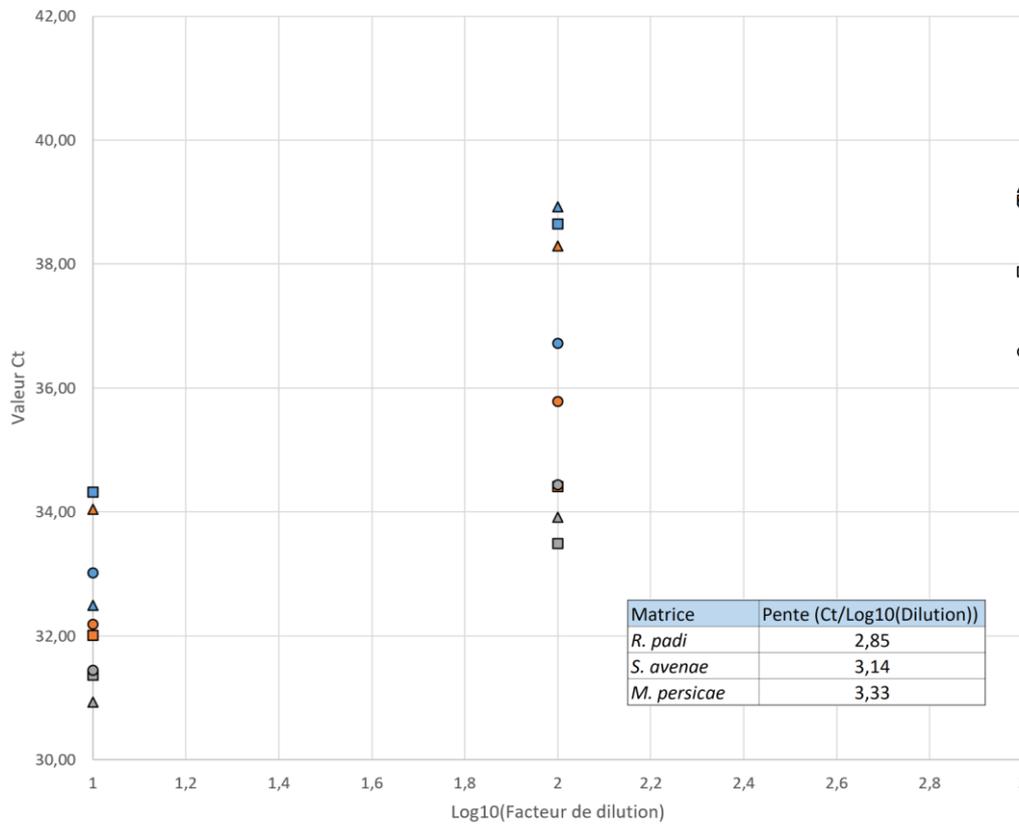
Offset (works like gap extension penalty)

Maximum number of iterative refinement

Annexe 1 : paramétrages de l'algorithme MAFFT dans le logiciel Unipro UGENE.

	PAV	MAV	RPV
Substrat	-0,01	-0,02	-0,01
Bruit de fond	0,09	0,10	0,09
Témoin négatif	0,00	-0,01	0,00
Témoin positif	0,80	0,24	0,59

Annexe 2 : Densité Optiques des différents puits pour substrat, bruit de fond et témoins positifs et négatifs pour les trois plaques DAS-ELISA pour le test de sensibilité, dilution de Sporobolus positif au BYDV testé avec les différents anticorps BYDV-PAV, BYDV-MAV et CYDV-RPV.



- ▲ P1 dans *R. padi* ▲ P1 dans *S. avenae* ▲ P1 dans *M. persicae*
- P2 dans *R. padi* ■ P2 dans *S. avenae* ■ P2 dans *M. persicae*
- P3 dans *R. padi* ● P3 dans *S. avenae* ● P3 dans *M. persicae*

Annexe 3: Analyse de la sélectivité du test RT-qPCR par dilution de *R. padi* dans 3 matrices différentes (3 réplicats biologiques et 1 réplicat technique), tableau des pentes pour chaque matrice de dilution.

8. Bibliographie

- Armand, T., Souquet, M., Korn, L., Gauthier, K., & Jacquot, E. (2023). Asymmetric interactions between barley yellow dwarf virus -PAV and wheat dwarf virus in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1194622>
- Ballandras, V., McNamara, L., Carolan, J. C., & Byrne, S. (2024). Development of a droplet digital PCR assay to detect and quantify BYDV-MAV and BYDV-PAS in their barley host and aphid vectors. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 63, 54-65. <https://doi.org/10.15212/ijafr-2023-0115>
- Bates, L. J., Pope, T. W., & Holland, J. M. (2020). Can a PCR assay of aphids caught in-crop on yellow sticky traps inform field level barley yellow dwarf virus risk assessment? *Annals of Applied Biology*, 177(2), 178-183. <https://doi.org/10.1111/aab.12601>
- Borgolte, S., Menzel, W., & Varrelmann, M. (2024). One-step TaqMan® RT-qPCR detection of sugar beet-infecting poleroviruses in *Myzus persicae* from yellow water pan traps opens up new possibilities for early risk assessment of virus yellows disease. *Journal of Virological Methods*, 331, 115052. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.115052>
- Brown, L. D., Cai, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statistical Science*, 16(2), 101-133. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines : Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Byrne, S., Schughart, M., Ballandras, V., Carolan, J. C., Sheppard, L., & McNamara, L. (2024). The first survey using high-throughput sequencing of cereal and barley yellow dwarf viruses in Irish spring and winter barley crops. 63. <https://doi.org/10.15212/ijafr-2023-0110>
- Canning, E. S. G., Penrose, M. J., Barker, I., & Coates, D. (1996). Improved detection of barley yellow dwarf virus in single aphids using RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 56(2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)01959-6](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)01959-6)
- Choudhury, S., Hu, H. L., H. Meinke, S. Shabala, G. Westmore, P. Larkin, Zhou MeiXue Zhou MeiXue. (2017). Barley yellow dwarf viruses : Infection mechanisms and breeding strategies. *Euphytica*, 2017, Vol. 213, No. 8, 168 ref. 229.
- Clark, M. F., & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*, 34(3), 475-483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>

D'Arcy, C. J., Burnett, P. A., (1995) Barley Yellow Dwarf 40 years of Progress. The American Phytopathological Society, 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota, USA.

Deb, M., & Anderson, J. M. (2008). Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 148(1-2), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.015>

Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuzet, L., Riault, G., Vialatte, A., & Jacquot, E. (2003). Improvement of *Barley yellow dwarf virus*-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 110(1), 51-60. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00097-1)

Fabre, F., Plantegenest, M., Mieuzet, L., Dedryver, C. A., Leterrier, J.-L., & Jacquot, E. (2005). Effects of climate and land use on the occurrence of viruliferous aphids and the epidemiology of barley yellow dwarf disease. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.07.004>

Foster, G. N., Blake, S., Tones, S. J., Barker, I., & Harrington, R. (2004). Occurrence of barley yellow dwarf virus in autumn-sown cereal crops in the United Kingdom in relation to field characteristics. *Pest Management Science*, 60(2), 113-125. <https://doi.org/10.1002/ps.796>

Gilabert, A., Gauffre, B., Parisey, N., Le Gallic, J.-F., Lhomme, P., Bretagnolle, V., Dedryver, C.-A., Baudry, J., & Plantegenest, M. (2016). Influence of the surrounding landscape on the colonization rate of cereal aphids and phytovirus transmission in autumn. *Journal of Pest Science*, 90(2), 447-457. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0790-3>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Hending, M., & Barišić, I. (2019). In-silico Design of DNA Oligonucleotides : Challenges and Approaches. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008>

Henry, M., & Dedryver, C. A. (1991). Occurrence of barley yellow dwarf virus in pastures of western France. *Plant Pathology*, 40(1), 93-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02297.x>

Henry, M., George, S., Arnold, G. M., Dedryver, C. A., Kendall, D. A., Robert, Y., & Smith, B. D. (1993). Occurrence of barley yellow dwarf virus (BYDV) isolates in different farmland habitats in western France and south-west England. *Annals of Applied Biology*, 123(2), 315-329. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04094.x>

Hoffman, T. K., & Kolb, F. L. (1998). Effects of Barley Yellow Dwarf Virus on Yield and Yield Components of Drilled Winter Wheat. *Plant Disease*, 82(6), 620-624.

<https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.620>

Ingwell, L. L., & Bosque-Pérez, N. A. (2015). New experimental hosts of Barley yellow dwarf virus among wild grasses, with implications for grassland habitats. *Plant Pathology*, 64(6), 1300-1307. <https://doi.org/10.1111/ppa.12387>

Irwin, M. E., Thresh, J. M., (1990) *Epidemiology of Barley Yellow Dwarf : A Study in Ecological Complexity*. ResearchGate.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002141>

Jarošová, J., (2013) *A comparative study of the Barley yellow dwarf virus species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance-Plant Pathology—Wiley Online Library*. (s. d.). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02644.x>

Jarošová, J., Beoni, E., & Kundu, J. K. (2016). Barley yellow dwarf virus resistance in cereals : Approaches, strategies and prospects. *Field Crops Research*, 198, 200-214.

<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.08.030>

Jarošová, J., Ripl, J., Fousek, J., & Kundu, J. K. (2018). TaqMan Multiplex Real-Time qPCR assays for the detection and quantification of Barley yellow dwarf virus, Wheat dwarf virus and Wheat streak mosaic virus and the study of their interactions. *Crop and Pasture Science*, 69(8), 765. <https://doi.org/10.1071/CP18189>

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT : A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

Kwok, S., Kellogg, D. E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., & Sninsky, J. J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction : Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 18(4), 999-1005. <https://doi.org/10.1093/nar/18.4.999>

Malmstrom, C. M., Bigelow, P., Trębicki, P., Busch, A. K., Friel, C., Cole, E., Abdel-Azim, H., Phillippo, C., & Alexander, H. M. (2017). Crop-associated virus reduces the rooting depth of non-crop perennial native grass more than non-crop-associated virus with known viral suppressor of RNA silencing (VSR). *Virus Research*, 241, 172-184.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.006>

- Malmstrom, C. M., & Shu, R. (2004). Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of barley and cereal yellow dwarf viruses. *Journal of Virological Methods*, 120(1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.04.005>
- McKirdy, S. J., Jones, R. a. C., & Nutter, F. W. (2002). Quantification of Yield Losses Caused by Barley yellow dwarf virus in Wheat and Oats. *Plant Disease*, 86(7), 769-773. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.769>
- Miller, W. A., Liu, S., & Beckett, R. (2002). Barley yellow dwarf virus : Luteoviridae or Tombusviridae? *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 177-183. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00112.x>
- Miller, W. A., & Rasochova, L. (1997). BARLEY YELLOW DWARF VIRUSES. *Annual review of phytopathology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.167>
- Minato, N., Hatori, S., Okawa, A., Nakagawa, K., & Hironaka, M. (2022). Manipulation of Insect Vectors' Host Selection Behavior by Barley Yellow Dwarf Virus Is Dependent on the Host Plant Species and Viral Co-Infection. *Life*, 12(5), 644. <https://doi.org/10.3390/life12050644>
- Nagy, A. A., Sharaf, A. N., Soliman, M. H., Shalaby, A.-B. A., & Youssef, A. (2006). Molecular characterization of barley yellow dwarf virus coat protein gene in wheat and aphids. *Arab Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 10, No. 1, 207-217 ref. 23
- Nancarrow, N., Aftab, M., Hollaway, G., Rodoni, B., & Trębicki, P. (2021). Yield Losses Caused by Barley Yellow Dwarf Virus-PAV Infection in Wheat and Barley : A Three-Year Field Study in South-Eastern Australia. *Microorganisms*, 9(3), 645. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030645>
- Newcombe, R. G. (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion : Comparison of seven methods. *Statistics in Medicine*, 17(8), 857-872. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19980430\)17:8<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:8<857::AID-SIM777>3.0.CO;2-E)
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team. (2012). Unipro UGENE : A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(8), 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pidon, H., Ruge-Wehling, B., Will, T., Habekuß, A., Wendler, N., Oldach, K., Maasberg-Prelle, A., Korzun, V., & Stein, N. (2024). High-resolution mapping of Ryd4Hb, a major resistance gene to Barley yellow dwarf virus from *Hordeum bulbosum*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 137(3), 60. <https://doi.org/10.1007/s00122-024-04542-y>
- Plumb, R. T. (1974). Properties and isolates of barley yellow dwarf virus. *Annals of Applied Biology*, 77(1), 87-91. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01393.x>

- Plumb, R. T. (1976). Barley yellow dwarf virus in aphids caught in suction traps, 1969-73. *Annals of Applied Biology*, 83(1), 53-59. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1976.tb01693.x>
- Riedel, C., Habekuß, A., Schliephake, E., Niks, R., Broer, I., & Ordon, F. (2011). Pyramiding of Ryd2 and Ryd3 conferring tolerance to a German isolate of Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV-ASL-1) leads to quantitative resistance against this isolate. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(1), 69-76. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1567-y>
- Rochow, W. F., Aapola, A. I. E., Brakke, M. K., & Carmichael, L. E. (1971). Purification and antigenicity of three isolates of barley yellow dwarf virus. *Virology*, 46(1), 117-126. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90011-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90011-0)
- Ryalls, J. M. W., & Harrington, R. (2017). Climate and Atmospheric Change Impacts on Aphids as Vectors of Plant Diseases. In S. N. Johnson & T. H. Jones (Éds.), *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates* (1^{re} éd., p. 148-175). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119070894.ch9>
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuß, A., Schrader, O., Pendinen, G., Fischer, K., & Wehling, P. (2009). Ryd4 Hb : A novel resistance gene introgressed from *Hordeum bulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5), 837-849. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1093-3>
- Suneson, C. A., (1955) Breeding for Resistance to Yellow Dwarf Virus in Barley *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.2134/agronj1955.00021962004700060014x>
- Simsek, M., & Adnan, H. (2000). Effect of single mismatches at 3'-end of primers on polymerase chain reaction. *Journal for scientific research. Medical sciences / Sultan Qaboos University*, 2(1), 11-14.
- Sömera, M., Massart, S., Tamisier, L., Sooväli, P., Sathees, K., & Kvarnheden, A. (2021). A Survey Using High-Throughput Sequencing Suggests That the Diversity of Cereal and Barley Yellow Dwarf Viruses Is Underestimated <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673218>
- Sylvester, E. S. (1980). Circulative and Propagative Virus Transmission by Aphids. *Annual Review of Entomology*, 25(1), 257-286. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.25.010180.001353>
- Thackray, D. J., Diggle, A. J., & Jones, R. a. C. (2009). BYDV PREDICTOR : A simulation model to predict aphid arrival, epidemics of Barley yellow dwarf virus and yield losses in wheat crops in a Mediterranean-type environment. *Plant Pathology*, 58(1), 186-202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01950.x>

Walls III, J., Rajotte, E., Rosa, C., (2019). The Past, Present, and Future of Barley Yellow Dwarf Management. *MDPI*. <https://doi.org/10.3390/agriculture9010023>

Van den Eynde, R., Van Leeuwen, T., Haesaert, G. (2020) Identifying drivers of spatio-temporal dynamics in barley yellow dwarf virus epidemiology as a critical factor in disease control. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.1002/ps.5851>

Voller, A., Bartlett, A., & Bidwell, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 31(6), 507-520. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.6.507>

Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association*, 22(158), 209-212. <https://doi.org/10.2307/2276774>