

Expériences de transmission par cochenilles de virus de la vigne

(Mode opératoire rédigé par INRA, UMR SVQV Colmar,
dans le cadre du projet Interreg 2016-2018 « InvaProtect »)

L'objet de cette fiche est de décrire les modalités des expériences de transmission des virus de l'enroulement et du complexe du bois strié de la vigne par des cochenilles, dans l'optique d'études du pouvoir vectrice de ces insectes. Elle est destinée aux partenaires du projet « InvaProtect », désireux de réaliser des expériences de transmission par cochenilles de la vigne. Il en existe une version allemande. Deux types d'expériences sont présentés :

I. **Expérience de transmission virale en conditions contrôlées**, nécessaire pour caractériser l'efficacité et/ou la variabilité vectrice de cochenilles au laboratoire ;

II. **Expérience d'infectivité naturelle** de cochenilles issues du vignoble, nécessaire pour estimer le potentiel vecteur d'une population naturelle.

Globalement, une expérience de transmission comprend successivement :

- une **phase d'acquisition** (*acquisition access period, AAP*) = temps de contact entre l'insecte (cochenille) et une source de virus (= plante-source) en vue d'acquérir le virus par prise alimentaire ; la durée de l'AAP est contrôlée dans le type I., mais non dans II. où les insectes sont prélevés au vignoble sur un plant virosé ;
- une **phase d'inoculation** (*inoculation access period, IAP*) = temps de contact entre l'insecte ayant acquis le virus (= virulifère) et une plante saine (= plante-test) en vue d'y inoculer le virus ; la durée de l'IAP est contrôlée dans I. et dans II. ;
- une **phase d'incubation** = temps pendant lequel la plante-test est conservée au laboratoire et/ou en serre pour permettre au virus de se répliquer, en attente de la détection de virus (ELISA et/ou RT-PCR) qui déterminera si la transmission s'est effectuée ou non.

I. Expérience de transmission virale en conditions contrôlées

Au préalable, cette expérience nécessite de disposer :

- de **cochenilles non-virulifères** : élevage sain de laboratoire, ou œufs de cochenilles (pour les espèces ovipares), ou prélèvement au vignoble sur plant avéré non virosé ;
- d'une source virale pour l'AAP : feuille détachée d'une plante d'infection virale connue, ou bouture infectée = **plante-source** ;
- de jeunes plants sains de vigne (= **plantes-tests**) produits en serre par bouturage (ou semis), pour l'IAP. Le nombre de plantes-tests dans chaque modalité (répétitions) est à déterminer en fonction du nombre de cochenilles à prévoir. Si le virus étudié est un vitivirus (GVA, GVB, ...), il est possible de prendre comme plantes-tests de jeunes plants de l'hôte herbacé multipliant le virus (ex. *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii* ; attention, ces espèces sont à utiliser très jeunes, car plus âgées elles développent des poils glandulaires qui peuvent « piéger » les cochenilles).

Précautions préalables : de préférence, la présence de virus dans la plante-source est vérifiée avant chaque test de transmission ; de même, l'absence de virus dans un échantillon des plantes-tests est vérifiée au préalable par ELISA. Préventivement, les plantes-sources et -tests peuvent être traitées régulièrement avec un insecticide, mais tout traitement devra être interrompu un mois avant les expériences.

Acquisition : l'AAP est réalisée de préférence sur une feuille détachée d'une plante infectée, ou plus rarement sur plante infectée entière. Les feuilles détachées sont mises 'en survie' (càd avec le pétiole muni d'un coton humide maintenu par du Parafilm®) dans des boîtes fermées (ex. beurrier, Spielmann, Petri) (Fig. 1) ; quant aux plantes entières, elles sont protégées sous un sachet individuel (ex. Breadbag®). Le dépôt et le maintien de cochenilles non-virulifères, soit libres sur la feuille en survie (Fig. 1), soit confinées dans une cagette étanche (*clip-cage*, capsule, petite boîte de Petri) « clippée » sur la feuille (Fig. 2), se fera dans le laboratoire.



Fig 1. Phase d'acquisition de virus par cochenilles sur une feuille de vigne virosée et placée 'en survie' dans une boîte Spielmann.



Fig. 2. Phase d'acquisition de virus sur plant virosé à l'aide de *clip-cages*. La même technique est aussi adaptée à la phase d'inoculation (Fig. 3).

Variante : l'AAP peut être réalisée avec des œufs d'une espèce ovipare (ex. *Parthenolecanium corni*), récoltés à partir de femelles matures puis tamisés. Pour l'AAP, plusieurs modalités peuvent être choisies :

- Les œufs sont mis à éclore pendant l'AAP sur une feuille détachée de la plante-source de virus et placée en 'survie' dans une boîte fermée (Fig. 1). Les larves néonates sont alors transférées sur les plantes-tests pour la phase d'inoculation, comme décrit ci-après.
- Ils sont mis à éclore directement sur la plante-source de virus, en *clip-cages* maintenues par une pince (Fig. 2).

Un lot de la même population d'œufs est maintenu à la même température, de manière à suivre la cinétique d'éclosion.

L'AAP maximale est de l'ordre de 2-4 jours. Après l'AAP, il est possible de vérifier que les cochenilles se sont bien alimentées sur les plants virosés, à l'aide d'une RT-PCR sur des lots de 10 individus.

Inoculation : après l'AAP, le transfert des cochenilles, censées être virulifères, à partir de la source virale (feuille, plante), est effectué dans un bac afin de limiter la dissémination des insectes. Cette opération est réalisée, soit à l'aide d'une aiguille montée permettant de saisir les cochenilles une à une et les placer dans une petite boîte ou cagette qui sera « clippée » sur la plante-test (Fig. 3), soit à l'aide d'un pinceau fin permettant de détacher quelques individus pour les faire tomber sur la plante-test, soit enfin en découpant la feuille-source en fragments portant le nombre désiré de cochenilles à transférer que l'on « clippe » sur la plante-test (cette dernière façon étant la moins dommageable pour l'insecte) (Fig. 4). Un minimum de 20-30 larves par plante-test est recommandé. Les plantes-tests ayant reçu les cochenilles censées être virulifères sont couvertes immédiatement (cylindre PVC avec toile, ou sachet de type Breadbag®). Elles restent ainsi confinées sous une rampe lumineuse au laboratoire durant toute l'IAP, de préférence à une température de 23-25°C et une photopériode de 16h/8h.



Fig 3. Phase d'inoculation de virus par cochenilles sur une plante-test saine par la technique des boîtes « clippées ».



Fig. 4. Phase d'inoculation de virus par la technique de la feuille (ou fragment) virosée portant des cochenilles après AAP et fixée sur la plante-test saine, permettant aux insectes de migrer sur la plante-test.

Il est important de laver le bac à l'eau chaude et de savonner les mains entre les différentes modalités (isolats viraux, espèces/isolats de vecteur, etc.). Toujours commencer par les plantes saines témoins (sans cochenille ou ayant reçu des cochenilles non-virulifères de même provenance). En fin de manipulation, nettoyer la paillasse à l'alcool et y vérifier l'absence de cochenilles.

A l'issue de l'IAP, les sachets sont ôtés avec précaution et la quantité de cochenilles fixées sur chaque plante-test est comptée, ou évaluée si >30. Les pseudococcides sont de préférence prélevées pour être, soit détruites, soit conservées en tubes pour d'éventuels tests de détection ultérieurs. Afin d'y éliminer toute cochenille, les plantes-tests sont alors traitées sous hotte ou sorbonne avec un insecticide homologué pour cochenilles. Ces plantes sont alors conservées dans l'attente de la détection de virus, autant que possible dans un compartiment spécialement dédié aux plantes inoculées, c'est-à-dire séparé physiquement de ceux où s'opère la production des plants sains ou des plants virosés. Ce compartiment dédié recevra une couverture insecticide.

Détection de l'infection des plantes-tests : elle s'effectue après 4-6 mois d'incubation du virus, en général une seconde détection est nécessaire à 10-12 mois, dans l'idéal après une période de froid et de repos de la vigne. Elle est réalisée en routine par la méthode ELISA, mais peut aussi se faire par RT-PCR, méthode plus précise évitant les faux positifs. Prélever sur chaque plante à tester un échantillon de 3 feuilles parmi les plus anciennes et réparties sur différents rameaux, ou alors du bois en hiver. Éviter de procéder à la détection quand la température en serre devient élevée et peut inhiber la multiplication virale.

II. Expérience d'infectivité naturelle

Au préalable, cette expérience nécessite de disposer :

- de **cochenilles potentiellement virulifères** prélevées au vignoble sur **plant avéré virosé** (càd AAP naturelle non contrôlée) ;
- de jeunes plants sains de vigne (= **plantes-tests**) produits en serre, pour l'IAP. Si le virus étudié est un vitivirus (GVA, GVB, ...), il est possible de prendre comme plantes-tests de jeunes plants de l'hôte herbacé multipliant le virus.

Les cochenilles sont prélevées en détachant une ou plusieurs feuille(s) sur des ceps connus pour porter un ou plusieurs virus, lesquelles sont emportées au laboratoire dans des récipients fermés. La phase d'inoculation (IAP) sur plantes-tests se fait exactement comme ci-dessus.. Se reporter à l'« Exp. I » ci-dessus, pour le traitement de fin d'IAP, la conservation des plants et la détection de l'infection.

Addendum : précautions générales

- préparer le plan de travail de la journée et le matériel (plantes, bacs, instruments, loupe binoculaire) ;
- porter une blouse ;
- chercher les plantes-sources (Exp. I.), avant de chercher les cochenilles, et éviter d'aller en serre ou en pièce climatisée après avoir manipulé des cochenilles ;
- vérifier l'absence initiale de cochenilles sur les plantes-tests utilisées ;
- ne travailler qu'avec une espèce (ou origine géographique) de cochenille à la fois pour éviter les contaminations ;
- opérer dans des conditions comparables (variété des plantes-tests, température, photopériode, durées d'AAP et d'IAP, nombre de cochenilles par plante-test).

Gérard HOMMAY et Etienne HERRBACH, INRA Colmar, 2018
traduit par Christoph HOFFMANN, JKI Siebeldingen

