



Plant
Health
Institute
Montpellier



IUT Paul Sabatier
Département Génie Biologique
24 rue d'Embaquès
32000 AUCH

Organisme d'accueil
CIRAD
42 rue Scheffer
75116 PARIS

RAPPORT DE STAGE

Etude de l'impact de la température sur la vection de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer (Badnavirus) par *Planococcus citri* (Risso)

Maîtres de stage : Emmanuelle MULLER, virologue, UMR AGAP

Régis BABIN, entomologiste, UMR PHIM

CIRAD, Département BIOS



Présenté par :

Chloé CAILLEAUD
AGRO 2019 - 2021

Remerciements

Au terme de ce travail durant ce stage, je voudrais remercier particulièrement mes deux maîtres de stage au CIRAD : Emmanuelle MULLER, virologue à l'UMR AGAP et Régis BABIN, entomologiste à l'UMR PHIM, actuellement expatrié en Côte d'Ivoire, pour leur aide dans l'intégration au sein de l'équipe de recherche et la supervision des expériences ainsi que l'appui au montage des protocoles expérimentaux. Je tiens également à remercier Bernard DUFOUR, entomologiste ayant travaillé au Togo sur la cochenille vectrice et le CSSV, pour son aide (construction de la bibliographie, discussions pertinentes) ainsi que pour son appui technique lors des manipulations de transmission et de l'élevage des insectes. Je tenais à remercier Fabienne RIBEYRE pour m'avoir intégrée aux seins des locaux et de l'équipe de recherche, et pour ses conseils et sa bienveillance.

Je tiens également à remercier l'entomologiste Nicolas SAUVION pour sa pédagogie et ses précieux conseils lors de l'intégration du sujet. Je souhaite remercier Frédéric DEDIEU pour ses conseils et aides notamment dans la culture des cacaoyers en serre et tous ses conseils sur les végétaux tropicaux.

Enfin, je remercie mon tuteur de stage, Victor PENOT, pour son suivi et ses conseils apportés tout au long du stage ainsi qu'Hervé ROBERT, responsable des stages de 2e année et Othmane MERAH, pour leur aide durant la recherche de stage.

Liste des abréviations

AGAP	Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales
AFD	Agence Française de Développement
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CSSD	Cacao Swollen Shoot Disease
CSSV	Cacao swollen shoot virus
DeSIRA	Development Smart Innovation through Research in Agriculture
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
ICCO	International Cocoa Organization ou Organisation Internationale du Cacao
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Réaction de polymérisation en chaîne
PHIM	Plant Health Institute of Montpellier
PRISM	Pôle Pathogènes et ravageurs des plantes : dynamiques et gestion du risque
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPR	Unité Propre de Recherche

Tables des matières

Table des illustrations	4
I. Introduction	5
1. Présentation de l'organisme d'accueil	5
2. Présentation des missions confiées lors du stage	6
II. Problématique et mise en œuvre du sujet	7
1. Contexte et enjeux	7
2. Moyens mis en œuvre	9
2.1 Présentation du modèle biologique	9
2.1.1 La plante-hôte : le cacaoyer	9
2.1.2. Le virus : Cacao Swollen Shoot Virus	11
2.1.3 L'insecte vecteur : la cochenille farineuse	11
2.1.4. Le mode de vection	12
2.2 Production et utilisation du matériel biologique	12
2.2.1 Production des plants sources	13
2.2.2 Prégermination des fèves	14
2.2.3 Élevage des cochenilles farineuses	15
2.3 Principes et manipulations	16
2.3.1 Manipulations de transmission	16
2.3.2 Détection du virus	18
3. Résultats obtenus et discussion	19
3.1 Mise en place de l'élevage	19
3.2 Développement du protocole de transmission	20
3.3 Analyse des résultats de transmission	22
Conclusion	24
Liste des compétences	25
Références bibliographiques	26
ANNEXE 1 : ORGANIGRAMME UMR PHIM	28
ANNEXE 2 : ORGANISATION DES MANIPULATIONS DE TRANSMISSION	29
ANNEXE 2 bis : ORGANISATION DES MANIPULATIONS DE TRANSMISSION	30
ANNEXE 3 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE PLANOCOCCUS CITRI	31
ANNEXE 4 : PHOTOTÈQUE DES ÉTAPES PRÉLIMINAIRES	32
ANNEXE 5 : PHOTOTHÈQUE DES EXPÉRIENCES	33
ANNEXE 6 : PHOTOTHÈQUE DES SEMIS	34

Table des illustrations

Figure 1 : Diagramme de la production mondiale de fèves de cacao (ICCO, 2019).....	7
Figure 2 : Gonflement et mort du bourgeon terminal sur cacaoyer, Côte d'Ivoire (Photo : Babin, 2021)	7
Figure 3 : Photo récolte cabosses de cacao (Financial Afrik, 2020)	9
Figure 4 : Plantation saine de cacaoyers, Côte d'Ivoire (Photo : Babin, 2021)	10
Figure 5 : Image au microscope électronique de particules virales du CSSV (Muller, 2021), 28x130nm.....	11
Figure 6 : Symptômes caractéristiques de la maladie du CSSV (Cilas, 2014)	11
Figure 7 : P.citri femelles adultes sur ovisacs, sur pomme de terre germée (Photo : Cailleaud, 2021).....	12
Figure 8 : 12 plants sources inoculés avec symptômes (Photo : Cailleaud, 2021)	13
Figure 9 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : production des plants sources	13
Figure 10 : Feuille issue de plant source avec rougissement des nervures (Photo : Cailleaud, 2021)	13
Figure 11 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : production de fèves prégermées.....	14
Figure 12 : Les différentes étapes de conditionnement des fèves avant prégermination	14
Figure 13 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : mise en place de l'élevage de P.citri	15
Figure 14 : Cages pour élevage des cochenilles	16
Figure 15 : Boîte "beurrier" pour élevage de cochenilles	16
Figure 16 : Schéma explicatif d'une semaine type de manipulations de transmission à une température donnée	17
Figure 17 : Clip-cage sur feuille de cacaoyer source après acquisition.....	18
Figure 18 : Prélèvement des cochenilles de stade L1 pour acquisition	18
Figure 19 : Fève prégermée après inoculation	18
Figure 20 : Echantillon pour extraction	19
Figure 21 : Cochenilles de stade L2 sur fèves prégermées, loupe binoculaire 10x0,5x1,5 (Photo : Cailleaud, 2021)	20
Figure 22 : Cochenilles femelles adultes sur pomme de terre, loupe binoculaire 10x0,5x1,5 (Photo : Cailleaud, 2021)	20
Figure 23 : Cochenilles de stade L1 sur cacaoyer, loupe binoculaire 10x0,5x1 (Photo : Cailleaud, 2021).....	20
Figure 24 : Cochenilles stade L1 mortes après jeûne, loupe binoculaire (Photo : Cailleaud, 2021)	20
Tableau 1 : Résultats de la prégermination des fèves.....	22
Figure 25 : Nuage de points renseignant sur le nombre de cochenilles accrochées aux fèves à la fin de l'inoculation en fonction des températures testées	21
Figure 26 : Gel n°1 Electrophorèse (Muller, 2121)	22
Figure 27 : Gel n°2 Electrophorèse (Muller, 2021).....	22

I. Introduction

1. Présentation de l'organisme d'accueil

Le CIRAD ou Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement est un organisme français de recherche agronomique et de coopération internationale pour le développement durable des régions tropicales et méditerranéennes (pays du sud).

L'organisme est divisé en trois départements scientifiques comprenant au total 30 unités de recherche réparties dans trois catégories différentes : unités propres de recherche (UPR), unités mixtes de recherche (UMR) et une unité de service. Les trois départements scientifiques sont :

- Systèmes biologiques (Bios),
- Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst),
- Environnements et sociétés (ES).

L'objectif de l'organisme est de bâtir une agriculture durable, adaptée aux changements climatiques, tout en préservant l'environnement et en assurant des revenus décents aux agriculteurs. Pour cela, les équipes du CIRAD travaillent en collaboration avec plus de 100 pays sur trois continents (Afrique, Asie et Amérique du Sud) pour leur fournir expertises et services comme des diagnostics agronomiques ou contribuer à l'amélioration variétale ainsi qu'à la sélection. En France, d'importants dispositifs de recherche situés principalement à Montpellier et dans l'outre-mer français, accueillent la communauté scientifique nationale et internationale. Un grand nombre de ces unités de recherche se penchent sur des problématiques de différentes filières tropicales comme le café, la banane, la canne à sucre ou encore le cacao depuis de nombreuses années. Le CIRAD compte 1650 salariés dont 800 chercheurs avec plus de 400 doctorants encadrés chaque année et dispose d'un budget annuel d'environ 200 millions d'euros. Plus de 800 projets actifs sont répertoriés au sein du CIRAD.

Au sein du département Bios, PHIM (Plant Health Institute of Montpellier) est une unité mixte de recherche (UMR) composée de chercheurs venant des instituts de recherche CIRAD, IRD et INRAE (ANNEXE 1) et d'enseignants chercheurs de l'Université de Montpellier et de l'Institut Agro. Les principaux objectifs de l'unité sont de comprendre les interactions entre micro-organismes et bioagresseurs afin d'analyser l'impact de ces interactions sur la santé des plantes. Des solutions (biocontrôle, biostimulation, etc.) sont ensuite proposées afin d'assurer une bonne productivité des cultures (banane, café, cacao, agrume, etc.). Les organismes étudiés sont les virus, les bactéries, les champignons, les nématodes ou encore les insectes.

Le stage est effectué au sein du pôle PRISM, qui est l'un des quatre pôles de l'UMR PHIM et qui est dirigé par Fabienne RIBEYRE (chercheuse biométricienne/modélisatrice). Dans ce pôle, les objectifs sont de comprendre les interactions entre plantes cultivées, bioagresseurs et facteurs environnementaux au sein d'agroécosystèmes tropicaux grâce à différentes disciplines : l'épidémiologie, l'entomologie, la phytopathologie et l'écologie. L'objectif finalisé de PRISM est de prédire le risque et de réduire l'impact des ravageurs et

des maladies sur les cultures pérennes tropicales. Le stage est supervisé par Régis BABIN, chercheur entomologiste de PRISM en poste en Côte d'Ivoire et Emmanuelle MULLER, chercheuse virologue d'une autre unité, l'UMR AGAP, composée également de chercheurs du CIRAD, de l'INRAE, de l'institut Agro et de l'Université de Montpellier. Le technicien serriste Frédéric DEDIEU intervient en appui technique pour ce stage. Dans le pôle PRISM, nous pouvons également compter sur la supervision de Nicolas SAUVION (chercheur entomologiste spécialiste des insectes vecteurs à l'INRAE), de Bernard DUFOUR, chercheur entomologiste du CIRAD.

2. Présentation des missions confiées lors du stage

Le stage porte plus particulièrement sur l'impact de la température sur la vection de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer (Badnavirus) par la cochenille farineuse *Planococcus citri* (Hemiptera ; Pseudococcidae).

Les missions qui m'ont été confiées avaient pour objectif général la mise en œuvre d'une expérimentation au laboratoire visant à décrire l'impact de la température sur la vection du Cacao swollen shoot virus (CSSV) par les cochenilles vectrices. Nous pouvons retrouver les missions suivantes :

- Le développement d'un protocole d'étude, basé sur une étude bibliographique des travaux réalisés sur le sujet comportant les principales étapes : acclimatation, acquisition, inoculation et incubation,
- La préparation et la gestion du matériel nécessaire à l'expérimentation : notamment la programmation de l'armoire et des chambres climatiques afin d'assurer le maintien des conditions optimales de manipulation (hygrométrie, température, ventilation, lumière),
- La mise en place et le suivi d'un élevage de *P.citri* avec la réception de la population de départ, la préparation des cages d'élevage, le renouvellement de nourriture, l'observation régulière des individus,
- La réception et la gestion du matériel végétal, les fèves de cacao provenant de Côte d'Ivoire, les plants sources, nécessaire à l'expérimentation,
- La collecte et l'analyse des données d'expérimentation, comme le traitement des données chiffrées sur les fèves prégermées de chaque lot et les données d'analyse moléculaire.

Après l'étude des différents stades de développement de *P.citri* avec les entomologistes, nous avons mis en place un élevage de ces insectes que nous avons suivi pendant ce stage. Ces connaissances nous ont ensuite permis de mener à bien les manipulations de transmission du virus du swollen shoot par cet insecte.

II. Problématique et mise en œuvre du sujet

1. Contexte et enjeux

La Côte d'Ivoire et le Ghana, les deux plus grands pays producteurs de cacao au monde, font face à des difficultés de taille qui mettent en péril la production de cacao : le changement climatique, la recrudescence de certaines maladies et l'instabilité des cours mondiaux du cacao. En effet, l'Afrique produit 76% de la production mondiale du cacao suivie par l'Amérique latine et l'Asie. En 2017, la Côte d'Ivoire a atteint une production record de 2 millions de tonnes de cacao, ce qui représente 46 % de la production mondiale (ICCO International Cocoa Organisation, 2019). Dans ce pays, comme au Ghana (deuxième producteur de cacao dans le monde), la cacaoculture fait vivre environ un million de petits agriculteurs. Cependant, avec l'instabilité des cours mondiaux du cacao, les faiblesses structurelles observées au sein de la filière mais surtout la propagation de la maladie du swollen shoot, cette production est menacée.

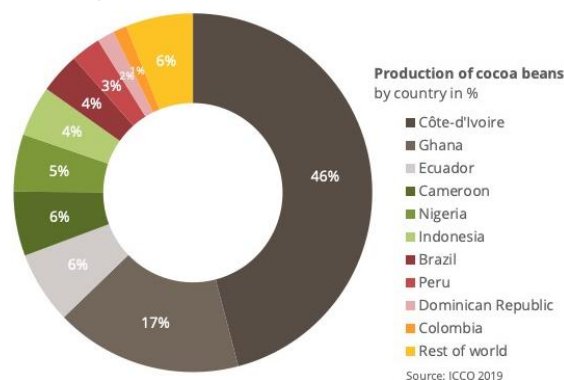


Figure 1 : Diagramme de la production mondiale de fèves de cacao (ICCO, 2019)

La maladie du swollen shoot provoquée par le Cocoa Swollen Shoot Virus (CSSV) a été signalée pour la première fois au Ghana dans les années 1920, premier pays producteur de cacao à l'époque, puis décrite et nommée seulement en 1936 par Posnette. Elle a été identifiée au Nigéria en 1944, en Côte d'Ivoire en 1946 puis au Togo en 1949. Cette maladie est considérée comme la principale maladie virale du cacaoyer d'Afrique de l'Ouest et elle a un impact direct sur la production du cacao. De nombreuses recherches ont été effectuées sur cette maladie depuis les années 1940 dans diverses institutions dont le CRIG (Cacao Research Institute of Ghana), pour étudier les questions de transmission par les cochenilles farineuses, l'épidémiologie de la maladie et l'amélioration génétique du cacao pour sa tolérance au virus.



Figure 2 : Gonflement et mort du bourgeon terminal sur cacaoyer, Côte d'Ivoire (Photo : Babin, 2021)

Afin d'expliquer l'expansion de la maladie en Côte d'Ivoire, la recherche met en cause l'adoption généralisée de la culture intensive du cacaoyer en monoculture ainsi que le réchauffement climatique. Ces deux facteurs engendreraient des conditions microclimatiques favorables à la fois à la vection par les cochenilles et à l'apparition des symptômes sur des cacaoyers (cf figure 2) rendus moins tolérants par le stress (Andres et al., 2018).

L'épidémie observée dans les années 50 au Ghana a montré que la propagation de la maladie induisait une chute de la production en fonction du niveau de résistance des variétés de cacaoyer et de la virulence de la souche virale impliquée. Les pertes occasionnées allaient de 25% à 90% au cours des 3 années suivant l'inoculation par une souche agressive au Ghana (Posnette et Todd, 1955). Le poids des fèves provenant de cabosses malades pouvait également être réduit de 50% (Posnette, 1947). Dans sa forme la plus sévère, le swollen shoot

peut tuer un cacaoyer atteint en moins de trois ans (Partiot et al., 1978). La maladie du Cocoa Swollen Shoot Virus constitue donc l'une des maladies virales dont les conséquences économiques sont les plus importantes dans le monde (Dzahini-Obiatey et al., 2010). La forme "Agou 1" au Togo ou "New Juaben" au Ghana sont décrites comme étant les formes les plus virulentes de la maladie, caractérisée par le gonflement des tiges et des racines et par des mosaïques "en plume" le long des nervures. Le rougissement des nervures des jeunes feuilles est une caractéristique facilement repérable sur les plantes jeunes et adultes.

A ce jour, la maladie n'a toujours pas été contrôlée au Ghana. Elle continue également de se propager dans de nouvelles zones, en particulier en Côte d'Ivoire, où elle est devenue la principale menace (Muller, 2021). De plus, la transmission du virus dans la nature se fait par l'intermédiaire d'insectes piqueur-suceurs de petite taille appelés cochenilles farineuses (Dufour et al., 1993), ce qui complique la tâche consistant à endiguer l'infection des cacaoyers par le virus.

Afin de déconnecter la cacaoculture de la déforestation qui lui est souvent associée et qui nuit gravement à l'environnement de ces deux pays, tout en contribuant à la restauration des cacaoyères dégradées, le CIRAD a monté le projet Cocoa4Future, dans le cadre de l'initiative DeSIRA de la Commission Européenne. Ce projet regroupe l'École supérieure d'Agronomie de l'INP-HB de Yamoussoukro, quatre universités ivoiriennes, une université ghanéenne ainsi que deux ONG (Organisation Non Gouvernementale) et d'autres partenaires. En février 2021, le CIRAD et ses partenaires signent un accord qui définit les modalités d'intervention de ce projet financé à hauteur de 6 millions d'euros par l'Union européenne et 1 million d'euros par l'AFD (Agence Française de Développement). Le projet Cocoa4Future va s'intéresser à améliorer la durabilité des systèmes de production et à promouvoir une dynamique nouvelle du secteur cacaoyer en Côte d'Ivoire et au Ghana pour une durée de 60 mois. Il va également s'intéresser à l'impact de l'agroforesterie sur les qualités organoleptiques (goût, odeur...) du produit fini afin d'améliorer la qualité du cacao.

L'objectif global de ce projet est de contribuer à l'amélioration de la durabilité des exploitations cacaoyères tout en préservant l'environnement (limiter la déforestation et reconstituer le couvert forestier) par l'adaptation des systèmes de cacaoculture à l'évolution du contexte en Côte d'Ivoire et au Ghana (expansion du CSSV, changement climatique, instabilité des cours mondiaux). Plus spécifiquement, ce projet vise une transition agroécologique et organisationnelle de la cacaoculture en proposant des recherches qui la fassent évoluer vers des systèmes de production en phase à la fois avec des objectifs de durabilité environnementale, de soutenabilité économique, de responsabilité sociale et les exigences de qualité, y compris éthique, des marchés matures comme des marchés émergents.

Le manque de travaux de recherche depuis plusieurs décennies sur la biologie et la transmission de la maladie du swollen shoot a poussé les chercheurs impliqués dans ce projet à proposer des actions de recherche dans ce domaine de manière à mieux comprendre les facteurs liés à l'expansion continue de cette maladie en Afrique de l'Ouest.

2. Moyens mis en œuvre

Dans le cadre du projet Cocoa4Future, le CIRAD a proposé un stage de laboratoire dans ses locaux du Campus International de Baillarguet, à proximité de Montpellier. L'objectif général du stage est de contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes de la vection de la maladie du swollen shoot par la cochenille vectrice *P.citri*.

Les objectifs spécifiques du stage sont donc de :

- Développer un protocole d'étude de la vection de la maladie par les cochenilles vectrices dans les conditions de laboratoire du CIRAD de Montpellier,
- Mettre en place et suivre un élevage de *P.citri*,
- Caractériser l'effet de la température sur les capacités des cochenilles à transmettre la maladie.

Le protocole d'étude de la vection comprend l'utilisation d'un élevage de cochenilles, la gestion du matériel végétal, la collecte et l'analyse des données d'expérimentation. Ce travail est nouveau en France : jusque-là, les manipulations étaient réalisées en Afrique de l'Ouest mais jamais en France. Cela impose donc des contraintes par rapport à la proximité du matériel biologique que sont les fèves de cacao. Il faut également s'approvisionner en cochenilles vectrices et s'adapter pour obtenir des plantes infectées par le virus.

2.1 Présentation du modèle biologique

Parmi le matériel biologique utilisé, on trouve l'insecte vecteur (*P.citri* (Risso)), la plante hôte (le cacaoyer) et le virus étudié (CSSV) qui sévit en Afrique de l'Ouest.

2.1.1 La plante-hôte : le cacaoyer

Le cacaoyer est une plante tropicale originaire d'Amérique latine qui pousse dans les régions chaudes et humides de part et d'autre de l'équateur. Aujourd'hui, elle est cultivée sur 5 millions d'hectares et les structures de production sont différentes suivant les continents. En Afrique, pratiquement toute la production de cacao provient de petits producteurs.

Dans ce contexte, la mise en place d'une nouvelle plantation nécessite d'éclaircir une forêt et d'y installer les plants de cacaoyers issus de graines germées. Après une trentaine d'années, les rendements diminuent à cause de l'âge, les sols s'appauvrissent à cause de la monoculture implantée et les agents pathogènes se multiplient. Il est alors nécessaire de renouveler sa plantation en y installant de nouveaux plants. Dans certaines régions où les terres sont encore disponibles, certains planteurs abandonnent leur plantation pour la renouveler quelques kilomètres plus loin ce qui conduit à la déforestation.



Figure 3 : Photo récolte cabosses de cacao (Financial Afrik, 2020)

Il existe 3 principaux groupes de cacaoyers :

- Le Criollo, donnant un cacao fin et originaire d'Amérique centrale et du Mexique. Il produit des cabosses vertes puis orangées une fois arrivées à maturité, contenant des grosses fèves claires. Il ne représente qu'1% de la production mondiale à cause de sa fragilité et de sa sensibilité aux maladies,
- Le Forastero, qui produit des fèves violettes et des cabosses similaires à celles du Criollo. Il provient d'Amazonie et est le cacao le plus produit dans le monde (près de 80%),
- Le Trinitario, hybride des deux groupes précédents. Identifié à Trinidad, ce cacao représente près de 20% de la production mondiale.

Le cacaoyer est cultivé de préférence entre 0 et 700 mètres d'altitude dans des zones à pluviosité régulièrement répartie sur l'année, possédant un sol profond et fertile. Il existe plusieurs façons de propager une culture de cacaoyer : par semis, par bouturage ou par greffage. La graine est prête à germer avant même la maturité du fruit : la cabosse. La germination se produit 4 à 5 jours après la maturité de la graine et les premières feuilles apparaissent une quinzaine de jours plus tard. Les jeunes plantules issues de semis sont d'abord cultivées pendant 8 mois en pépinière avant d'être replantées, au début de la saison des pluies, soit sous couvert forestier aménagé, soit sous ombrages artificiels ou encore sous des plantes cultivées plus grandes telles que les bananiers ou les cocotiers. Le cacaoyer commence à produire à partir de 3 ou 4 ans et une fois adulte (vers 6 ans), il produira pendant une quarantaine d'années entre 20 et 80 cabosses par an en fonction des variétés. Cette production va débiter par l'apparition de milliers de fleurs blanches ou jaune rosé qui vont pousser en bouquets sur le tronc et les branches principales. Elles vont être pollinisées par plusieurs insectes différents mais seulement 1% de ces fleurs deviendront des cabosses. Une fleur va donner une quarantaine de graines qui vont former les fèves à l'intérieur de la cabosse.

De nombreux facteurs climatiques peuvent intervenir dans la culture du cacaoyer. Le climat intervient directement sur la croissance et le développement du cacaoyer. Les principaux facteurs climatiques agissant sur le cacaoyer sont la température, la pluviométrie, l'humidité atmosphérique et la lumière (Mossu, 1990). Le cacaoyer exige une température relativement élevée entre 21 et 32 °C. La pluviométrie influence significativement le rendement annuel des cacaoyers car ceux-ci sont très sensibles à une déficience hydrique. Les pluies doivent être abondantes mais surtout bien réparties tout au long de l'année. Ces paramètres vont donc être étudiés en vue de lutter contre l'effet du réchauffement climatique sur la culture du cacaoyer.

Le rendement peut être supérieur à une tonne de cacao sec à l'hectare. Mais les rendements des cacaoyères en Afrique de l'Ouest sont souvent peu élevés (300 à 400 kg/ha), à cause de l'âge généralement avancé des plantations et des attaques fréquentes de nombreux parasites ou maladies.



Figure 4 : Plantation saine de cacaoyers, Côte d'Ivoire (Photo : Babin, 2021)

L'une des priorités de la recherche est de créer des systèmes de culture respectueux de l'environnement à base de cacaoyers stables dans l'espace et dans le temps.

2.1.2. Le virus : Cacao Swollen Shoot Virus

Le virus du swollen shoot ou virus des pousses gonflées est classé dans le genre *Badnavirus* en raison de sa morphologie bacilliforme non enveloppée et de son ADN double brin. Il fait partie de la famille des *Caulimoviridae*. Au moins huit espèces virales de la famille des *Caulimoviridae* et du genre *Badnavirus* seraient responsables des symptômes plus ou moins graves de la maladie du swollen shoot du cacaoyer (Muller et al., 2018).

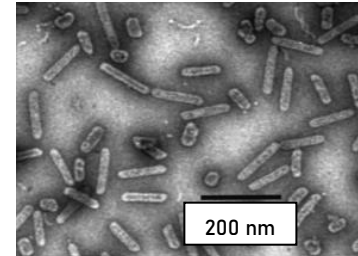


Figure 5 : Image au microscope électronique de particules virales du CSSV (Muller, 2021), 28x130nm



Figure 6 : Symptômes caractéristiques de la maladie du CSSV (Cilas, 2014)

Une fois la plante infectée, les symptômes de cette maladie virale se traduisent par des modifications de la morphogénèse de l'arbre (appareil aérien et système racinaire). Les premiers symptômes apparents sont des chloroses et des mosaïques sur les feuilles, en particulier le rougissement des nervures des jeunes feuilles et le gonflement anormal des rameaux de la plante. Le CSSV y est donc plus concentré (dans les jeunes feuilles).

L'infection par le virus entraîne surtout des désordres de croissance des branches et des cabosses, une altération de la circulation de la sève qui entraîne le dessèchement et la chute des feuilles et la mort des cacaoyers en quelques années. La productivité des cacaoyers atteints baisse rapidement.

2.1.3 L'insecte vecteur : la cochenille farineuse

Le virus du swollen shoot a pour vecteurs naturels une quinzaine d'espèces de cochenilles farineuses (Hemiptera : Pseudococcidae) (Wetten et al., 2016). La production de cochenilles vectrices au moyen d'un élevage est donc essentielle pour la réalisation des manipulations afin de transmettre naturellement le virus du plant source à la fève prégermée. Pour cela, nous avons choisi d'élever la cochenille *P.citri* (Risso) comme de nombreux chercheurs ayant étudié la vexion de ce virus, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cet insecte fait partie des cochenilles les plus communes et est retrouvé sur tous les continents. De plus, il est très résistant et supporte bien les conditions d'élevages dont diverses méthodes sont maîtrisées. Enfin, *P.citri* est parmi les espèces dont les capacités de transmission du virus au cacaoyer sont les plus élevées (Wetten et al., 2016).

La cochenille farineuse, *P.citri* (Risso) est un insecte faisant partie du groupe des piqueurs-suceurs de sève de l'ordre des Hémiptères et de la famille des Pseudococcidae (Kaur Gill et al., 2019). D'après Entwistle (1972), la période de développement larvaire sur le cacaoyer prendrait, entre l'éclosion de l'œuf et l'émergence de la femelle adulte, entre 32 et

38 jours en Côte d'Ivoire et au Ghana. La fécondité dépend de la plante-hôte et de la température. Sur le cacaoyer, la fécondité est estimée à 150-200 œufs en Côte d'Ivoire et entre 20 et 250 œufs au Ghana. Ses œufs sont enveloppés dans une boule de cire appelé ovisac produit par la femelle avant la ponte, ce qui va leur donner une protection supplémentaire avant l'éclosion. En Europe, cet insecte s'attaque aux agrumes et plantes ornementales pour se nourrir, notamment dans les cultures protégées (serres) et va être retrouvé sur l'ensemble de la plante. Mais *P.citri* est également très abondante dans les cacaoyères en Côte d'Ivoire et au Ghana et très difficile à contrôler avec des insecticides. Plusieurs tentatives de lutttes biologiques ont été testées telle que l'utilisation de parasitoïdes mais n'ont pas prouvé leur efficacité.

Le miellat produit par ces insectes va attirer les colonies de fourmis coccidophiles qui, en échange du miellat, vont aider les cochenilles farineuses à infester de nouveaux cacaoyers et vont les protéger contre leurs ennemis naturels . Ce miellat est aussi responsable d'une maladie fongique appelée fumagine (maladie cryptogamique provoquée par des champignons ascomycètes et saprophytes), dont l'impact sur la production reste limité.

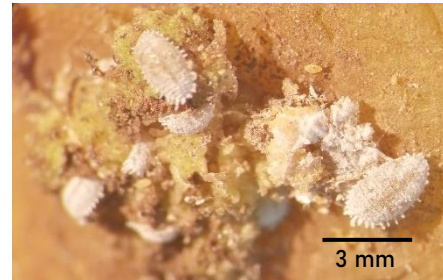


Figure 7 : P.citri femelles adultes sur ovisacs, sur pomme de terre germée (Photo : Cailleaud, 2021)

2.1.4. Le mode de vection

La vection est dite non circulante et semi-persistante, c'est-à-dire que le virus ne pénètre pas dans les organes de l'insecte et reste localisé aux pièces buccales, et que la période pendant laquelle la cochenille est infectieuse (période de rétention) est relativement courte, au maximum 2 jours selon Roivainen (1976).

Le taux d'acquisition du virus augmente fortement avec une mise en contact passant de 12 à 20 heures et apparaît maximal à partir de 24 heures. L'état infectieux de la cochenille décroît rapidement dans les heures qui suivent l'acquisition mais elle peut transmettre une deuxième fois sur une nouvelle plante après une inoculation de deux heures sur une première. (Dufour, 1988).

2.2 Production et utilisation du matériel biologique

Après avoir pris connaissance du modèle biologique utilisé, nous avons mis en place les étapes préliminaires nécessaires au déroulement des manipulations de transmission. Trois étapes préliminaires étaient nécessaires : la production de plants sources, la prégermination des fèves et la mise en place de l'élevage de cochenilles.

2.2.1 Production des plants sources

Afin de réaliser les tests de vection du swollen shoot sur des plants de cacaoyers sains, 12 plants sources ont été produits à partir de fèves de cacao provenant de Guyane, de variété Amelonado. Cette variété étant sensible au swollen shoot, la maladie est facilement visible lorsqu'un plant est infecté. Le virus a été transféré dans les plants par l'intermédiaire de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, ayant été préalablement désarmée et contenant le plasmide pBCPX-2 où a été cloné le génome d'un isolat de CSSV (Jacquot et al., 1999). Une inoculation a été réalisée début février 2021 sur chacun des plants issus des fèves mises à germer en décembre 2020. A l'intérieur de la plante, le plasmide introduit dans les cellules végétales grâce à la bactérie *A. tumefaciens* va relarguer le génome viral qui va rapidement circuler et infecter la plante.



Figure 8 : 12 plants sources inoculés avec symptômes (Photo : Cailleaud, 2021)

Schéma explicatif de l'étape préliminaire : production de plants sources

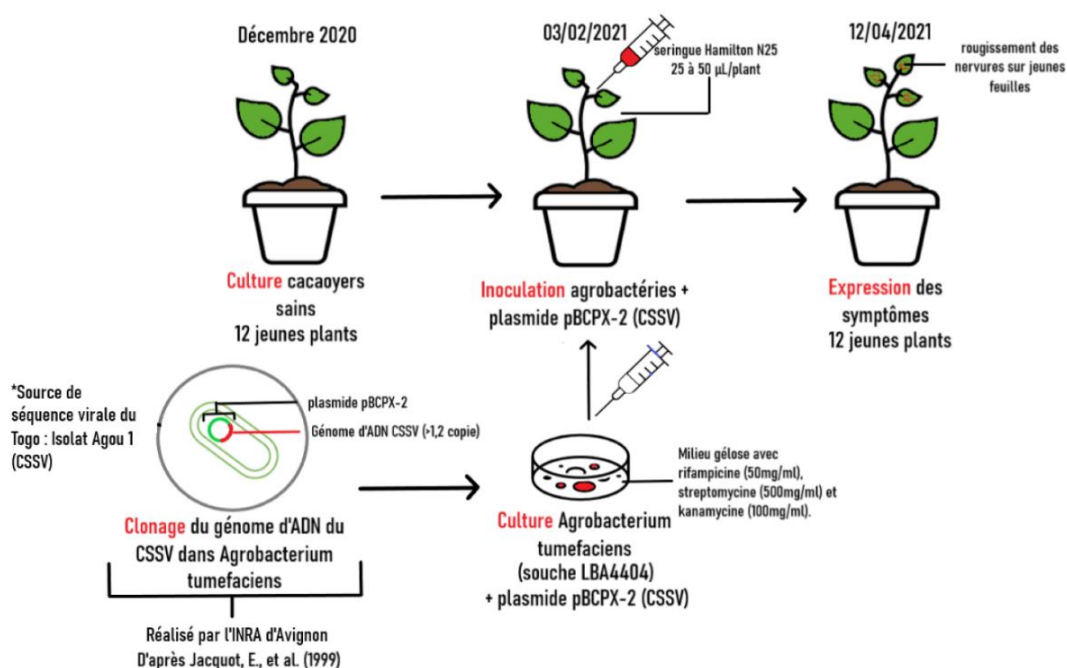


Figure 9 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : production des plants sources

La présence du CSSV a été détectée deux mois après inoculation par amplification PCR avec des amorces spécifiques de l'isolat viral inoculé. Les premiers symptômes de la maladie ont été constatés après deux mois et demi d'incubation en serre climatique ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ et HR^1 à $70 \pm 10\%$) par le rougissement des nervures des jeunes feuilles (premier symptôme de la maladie).



Figure 10 : Feuille issue de plant source avec rougissement des nervures (Photo : Cailleaud, 2021)

¹ Humidité Relative : degré hygrométrique correspondant à la quantité de vapeur d'eau dans l'air par rapport à la capacité maximale qu'il peut contenir

2.2.2 Prégermination des fèves

Nous avons ensuite fait venir par avion, des cabosses provenant de plantations localisées en Côte d'Ivoire, près d'Abidjan, afin de pouvoir en extraire régulièrement les fèves de cacao, nécessaires à notre expérimentation. Les envois ont été mis en place en fonction des besoins et des disponibilités de chercheurs en mission sur place et qui pouvaient ramener ces cabosses en France dans leurs bagages à mains (pour éviter l'exposition des fèves à de trop faibles températures, inférieures à 15°C, qui réduirait leur pouvoir germinatif). Les cabosses sont arrivées par lots de trois ou quatre, de manière quasiment hebdomadaire, durant l'entièreté de la période de manipulation. Dans la mesure du possible, les cabosses utilisées ont été prélevées sur un même arbre ou d'apparence la plus proche possible et proviennent de la même variété hybride produite par le CNRA (Centre National de la Recherche Agronomique) en Côte d'Ivoire.

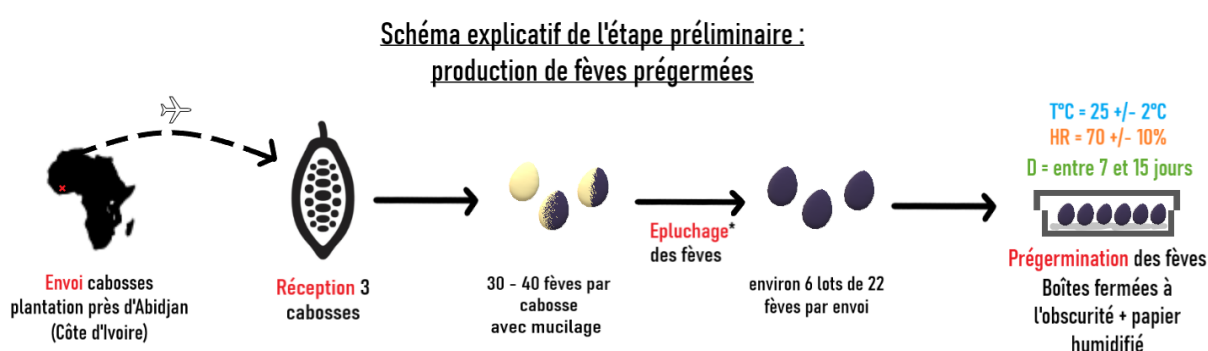


Figure 11 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : production de fèves prégermées

Une fois les cabosses ouvertes, les fèves ont été débarrassées du mucilage et déposées sur du papier absorbant humide, afin d'éviter le dessèchement. Le mucilage est enlevé pour éviter le développement de maladies cryptogamiques (phytophthora, fusarium) et la peau des fèves est retirée pour favoriser la germination. Les fèves ont été placées dans des boîtes en plastique fermées (boîte 10,5 par 10,5 cm), à l'obscurité pendant toute la durée de germination (entre 4 et 15 jours). Nous avons ensuite sélectionné les fèves ayant un germe compris entre 1,5 et 4,5 centimètres de long. Il faut savoir que la vitesse de germination varie en fonction des lots de fèves, nous avons donc sélectionné nos lots pour l'inoculation en fonction de la longueur du germe et non en fonction du temps de prégermination. Les données des longueurs et largeurs de fèves, ainsi que des longueurs de germes ont été collectées afin d'obtenir des lots de fèves prégermées homogènes pour les manipulations de transmission, et ainsi apporter des précisions aux expériences futures réalisées dans le cadre du projet. Ces données ont été reportées dans le tableau 1.



Figure 12 : Les différentes étapes de conditionnement des fèves avant prégermination

2.2.3 Élevage des cochenilles farineuses

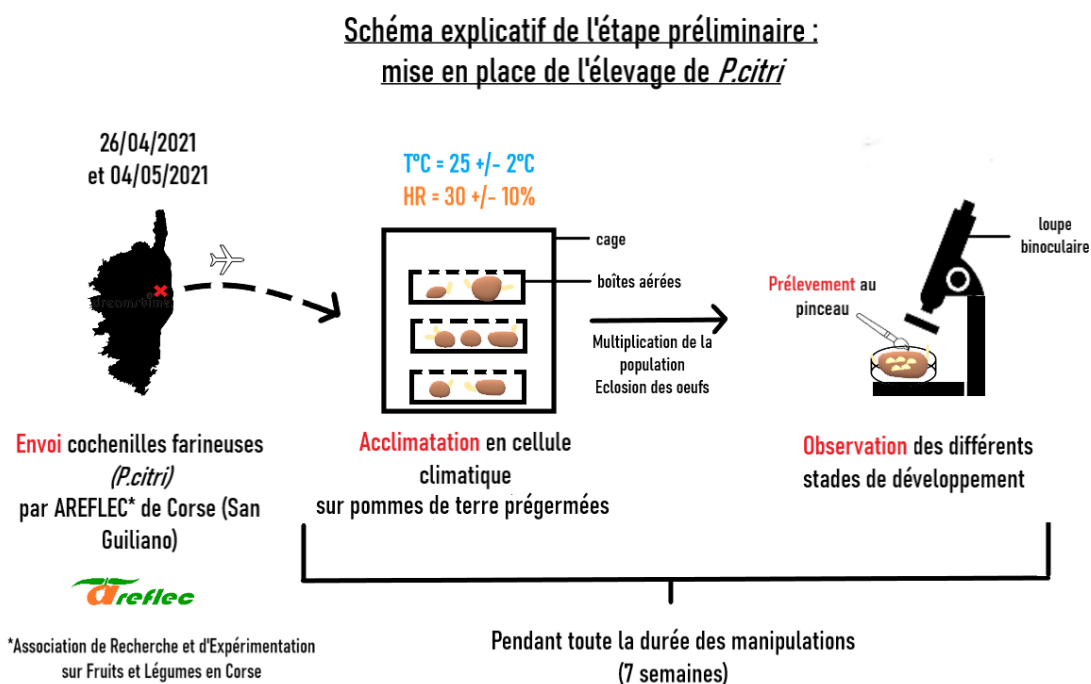


Figure 13 : Schéma explicatif de l'étape préliminaire : mise en place de l'élevage de *P.citri*

Nous avons fait venir de Corse une population de *P.citri* de l'association AREFLEC en deux envois successifs, qui est une association de recherche et d'expérimentation sur fruits et légumes en Corse, spécialisée dans les cultures présentes sur le pourtour méditerranéen (agrumes, oliviers, etc.) et ayant plusieurs élevages de cochenilles prélevées sur citrus, nécessaires aux travaux de recherches effectués sur place. Nous avons mis cette population de cochenilles en élevage dans des boîtes aérées au sein de deux cages à l'intérieur d'une cellule climatique, à la température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et avec une humidité relative de $30 \pm 10\%$. Par souci d'optimisation (faisabilité pratique et coût financier), l'élevage se fait majoritairement sur des germes de pommes de terre. C'est pourquoi, nous avons utilisé la variété de pomme de terre « Monalisa » comme support d'élevage car ses germes sont charnus et suffisamment souple pour permettre aux cochenilles de se fixer et de se développer.

Nous avons mis en place une prégermination de pommes de terre pendant la durée des manipulations afin de renouveler de manière hebdomadaire le support végétal de l'élevage. Une fois les cochenilles transférées sur pommes de terre, nous avons réparti les deux envois de cochenilles dans quatre boîtes « beurrier » (dimensions : 26,5 cm par 13,5 cm, cf ci-contre) contenant 5 à 6 pommes de terre chacune. Les populations des deux envois ont été séparées dans deux cages différentes. Ces cages de dimensions : 80 cm de hauteur, 40 cm de largeur et 60 cm de profondeur, étaient en plexiglass et comprenaient une paroi en tissus de moustiquaire pour faciliter l'aération.

Après une semaine d'acclimatation dans la chambre climatique, réglée sur $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $30 \pm 10\%$, et à l'aide d'observations à la loupe binoculaire (grossissement

10x0,5x1,5), nous avons identifié les différents stades larvaires des cochenilles pour pouvoir sélectionner dans l'expérimentation les larves de stade 1.



Figure 15 : Boîte "beurrer" pour élevage de cochenilles



Figure 14 : Cages pour élevage des cochenilles

2.3 Principes et manipulations

Les manipulations effectuées précédemment nous ont permis de réaliser les manipulations de transmission qui vont suivre.

2.3.1 Manipulations de transmission

Le but des manipulations est d'étudier l'impact de la température sur la vécution du swollen shoot virus du cacao par l'intermédiaire de la cochenille farineuse *P.citri*. Pour cela nous avons établi un protocole précis des manipulations de transmissions à effectuer pendant la durée du stage (ANNEXE 2).

Nous avons sélectionné les températures suivantes : 20, 22, 24, 26, 28 et 30°C car elles se trouvent dans les gammes de températures pouvant être observée en Côte d'Ivoire. Nous avons programmé ces températures dans l'armoire climatique où se déroulent les étapes d'acquisition et d'inoculation.

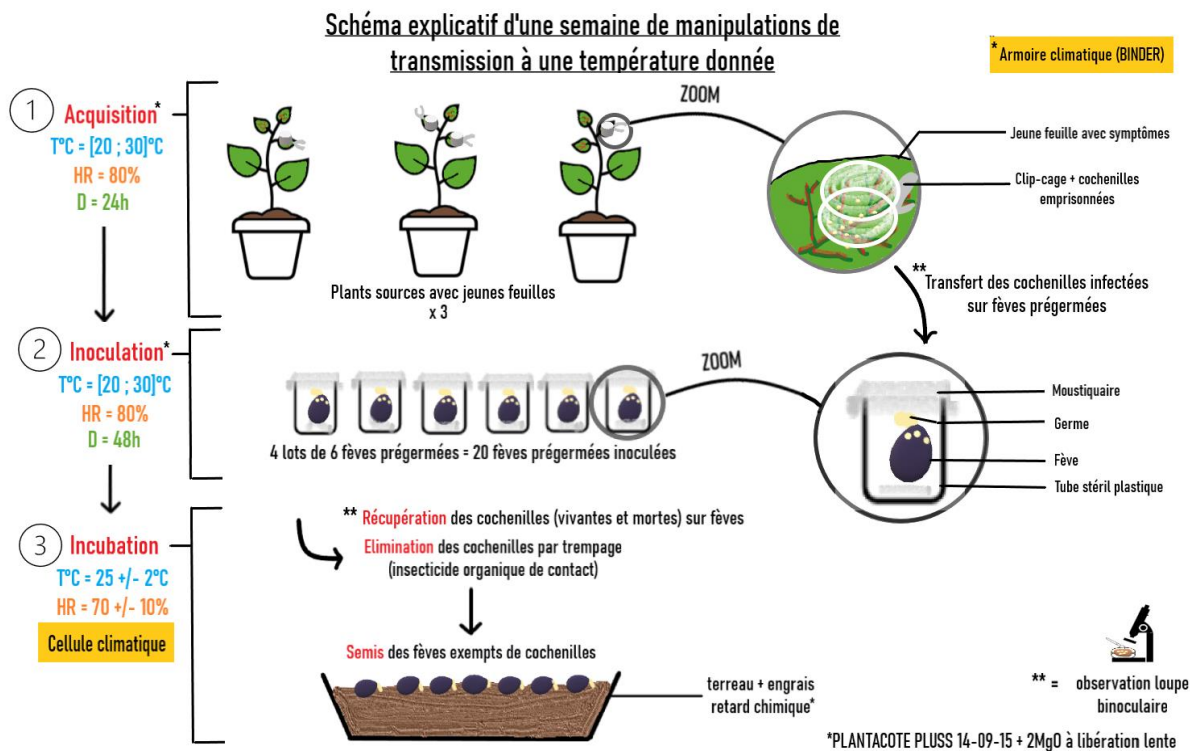


Figure 16 : Schéma explicatif d'une semaine type de manipulations de transmission à une température donnée

Ces essais ont été étalés sur 7 semaines de manipulations et sont rythmés par l'envoi des cabosses (cf ANNEXE 2, 2bis). Nous avons donc planifié un envoi de cabosse chaque semaine de manipulation.

Un semaine type de manipulation a été réalisée afin de tester les différentes étapes de manipulations comprenant : le jeûne des cochenilles, l'acquisition sur les plants sources, l'inoculation sur les fèves prégermées et l'incubation sur les jeunes plants, mais le jeûne a été abandonné suite à un taux de mortalité de 100% des cochenilles de stade L1 privées de support végétal pendant 24 heures.

Les essais ont tous débuté par une période d'acquisition de 24 heures (temps d'acquisition observé par Dufour, 1988), durant laquelle les vecteurs (*P.citri* (Risso)) sont en contact avec la source du virus (plants sources), la durée « réelle » du repas « infectieux » n'étant pas connue.

Au début de cette étape, les 100 larves de stades L1 ont été collectées (cf figure 17) dans l'élevage, puis réparties sur 4 ou 5 jeunes feuilles de 3 plants sources différents, sur une zone d'environ 5 centimètres de diamètre. Des clips-cages ont été utilisées pour maintenir les cochenilles à la surface des jeunes feuilles. Les cochenilles étaient donc enfermées à l'intérieur des clips-cages, qui étaient elles-mêmes fixées sur un tuteur afin de ne pas imposer le poids des clips-cages à la feuille (cf figure 16).



Figure 18 : Prélèvement des cochenilles de stade L1 pour acquisition



Figure 17 : Clip-cage sur feuille de cacaoyer source après acquisition

Après l'acquisition, l'étape d'inoculation a consisté à transférer les cochenilles infectieuses sur les fèves prégermées (cf figure 10). Pour cela, les clips-cages ont été soigneusement ôtées des feuilles, puis nous avons observé les feuilles afin de constater une potentielle mortalité des larves. Les cochenilles ont été ensuite transférées à l'aide d'un pinceau fin sur les fèves prégermées sélectionnées, à raison de 3 cochenilles par fève, en veillant à ne pas décrocher brusquement les insectes pour ne pas endommager le rostre². Ensuite, les fèves prégermées et identifiées hébergeant les cochenilles ont été transférées chacune dans un tube stérile (dimensions : 7 cm de hauteur de 3 cm de diamètre) à l'horizontal avec un papier absorbant l'humidifié (cf figure 18). Pendant cette période d'acquisition, les cochenilles ont été maintenues sur les fèves prégermées pendant 48 heures.



Figure 19 : Fève prégermée après inoculation

Avant la période suivante, la période d'incubation, nous avons éliminé les cochenilles présentes sur les fèves grâce à l'observation des fèves à l'aide d'une loupe binoculaire. Nous avons dénombré les cochenilles retrouvées puis pulvérisé les fèves à l'aide d'un insecticide biologique de contact anti-cochenilles afin d'éliminer les cochenilles qui auraient pu nous échapper. Cette manipulation a été réalisée selon les consignes de sécurité en vigueur (Port d'EPI, gants, blouse, masque, manipulation sous hotte aspirante). Une fois les cochenilles éliminées, nous avons semé les fèves prégermées potentiellement inoculées dans des jardinières de terreau, le germe orienté vers le bas, puis nous les avons placées en cellule climatique (25 ± 2°C et 70 ± 10% d'humidité relative) et arrosées régulièrement pour que les plants se développent.

2.3.2 Détection du virus

Dans le cas où aucun symptôme caractéristique n'apparaît pouvant indiquer que le virus a bien été transmis aux fèves par les cochenilles au moment de l'inoculation, il a été nécessaire de rechercher la présence du virus par un diagnostic approprié.

² Rostre : pièce buccale des insectes piqueurs-suceurs, permettant la pénétration à l'intérieur des cellules végétales pour en extraire le liquide nutritif

Dans notre cas, nous avons choisi de faire une détection du virus par amplification PCR après une extraction de l'ADN d'un morceau de jeune feuille, à raison d'une feuille par fève ayant germé après l'incubation. Cinquante milligrammes de feuille sont broyés à l'aide d'un GenoGrinder (broyeur) dans des tubes de 2 millilitres contenant deux billes de céramique (cf figure 19) (2 broyages de 1 min à 1300 rpm), puis l'ADN est extrait à l'aide du kit PlantDNeasy (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Le génome viral est ensuite détecté par amplification PCR.



Figure 20 :
Echantillon pour
extraction

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage afin de séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces de chaque côté de la séquence à amplifier (à une température appelée T_m ou température de fusion) et une élongation par l'action d'une ADN polymérase.

La PCR a été réalisée en utilisant le couple d'amorces ci-dessous :

CSSTBV ORF3AF TCGTCATACCAGATACCATGATGAC fragment 534 pb
CSSTBV ORF3AR ATTCCATTACTAGATTCTCCCATAC

La PCR a été réalisée, sur 2 millilitres de chaque échantillon extrait, avec la Taq Phire hot start II (Thermofisher) dans un volume total de 20 μL constitué de 4 μL de tampon 5X (fourni par le fabricant), 1,6 μL de dNTP (à 2,5 mM chacun), 1 μL de chacune des amorces (10 μM), 0.4 μL d'enzyme (5U/ μL), 10 μL d'eau. Le programme d'amplification comprend une première étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, suivie de 40 cycles de 98°C pendant 5 secondes, 62°C (T_m) pendant 5 secondes, 72°C pendant 5 secondes. Une étape finale d'élongation se fait à 72°C pendant 10 minutes. La Taq Phire hot start II (Thermofisher) est une enzyme plus efficace que la plupart des Taq polymerases et permet de mettre en place des programmes d'amplification très courts. Les produits PCR ont été visualisés après électrophorèse, à 100V pendant 25 minutes, en déposant 6 μL de produit PCR sur un gel d'agarose 1% dans du TAE³ et coloration au bromure d'éthidium.

3. Résultats obtenus et discussion

3.1 Mise en place de l'élevage

Nous avons débuté l'élevage au moyen de deux populations de *P.citri* différentes contenant chacune environ 300 larves de stade 1 et 100 femelles adultes (cf figure 21). Au bout d'une semaine, le nombre d'individus n'avait pas augmenté. Mais après un mois, la population a été multipliée par deux environ. Ce bon résultat a été obtenu par l'observation du nombre de femelles adultes et l'apparition de mâles adultes. De nombreuses larves de stade 1 (cf figure 22) ont été observées à partir de la cinquième semaine, ce qui nous permet de conclure que notre élevage a été pleinement opérationnel au bout de cette période.

³ TAE : Solution de tampon contenant un mélange de base Tris, d'acide acétique et d'EDTA
18/06/2021

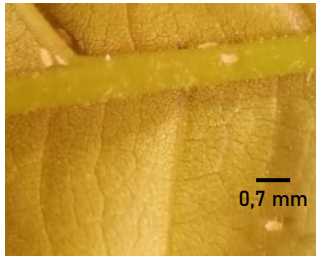


Figure 23 : Cochenilles de stade L1 sur cacaoyer, loupe binoculaire 10x0,5x1 (Photo : Cailleaud, 2021)



Figure 22 : Cochenilles de stade L2 sur fèves prégermées, loupe binoculaire 10x0,5x1,5 (Photo : Cailleaud, 2021)



Figure 21 : Cochenilles femelles adultes sur pomme de terre, loupe binoculaire 10x0,5x1,5 (Photo : Cailleaud, 2021)

L'avantage de la mise en place d'un élevage de cochenilles vectrices au laboratoire est de disposer par la suite d'un nombre suffisant d'individus pour pouvoir effectuer les manipulations de vexion. Nous considérons avoir atteint cet objectif puisque nous avons produit un nombre suffisant de larves de stade 1 au bout de 5 semaines d'élevage. Les populations provenant de Corse se sont donc bien adaptées à nos conditions d'élevage (températures, humidité).

3.2 Développement du protocole de transmission

Lorsque nous avons ouvert les cabosses provenant de Côte d'Ivoire, nous avons constaté une forte variabilité de la forme et de la couleur des fèves. Les fèves semblent donc présenter une importante variabilité génétique, qui pourrait être due au fait qu'il s'agit de matériel végétal hybride sélectionné et aussi que la pollinisation d'une fleur de cacaoyer peut se faire par du pollen provenant de plusieurs cacaoyers. Notre travail de tri nous a permis de rassembler dans les lots utilisés pour l'inoculation (cf figure 24) les fèves les plus vigoureuses (visuel) avec un germe en bonne santé (blanc, non nécrosé). Cependant, même avec plusieurs cabosses dans un envoi, un lot de fèves pouvait comporter une voire plusieurs anomalies, rencontrées à l'état naturel (moisissure, nécrose du germe). Le nombre, fixé à 20 fèves par lot a été volontairement augmenté de 2 fèves de plus pour faire face au rejet de certaines fèves. Nous avons donc réussi à extraire un total de 132 fèves prégermées de bonne qualité pour les inoculations (cf tableau 3, annexe 2 bis).

Le protocole prévoyait initialement de faire jeûner les larves de stades 1 pour accroître l'appétit des cochenilles avant la période d'acquisition. Mais le jeûne a été abandonné suite à un taux de mortalité de 100% des larves de stade 1 après 24 heures de privation d'alimentation. Cette étape a été jugée inutile car visuellement, les cochenilles de stade L1 s'alimentaient peu de temps après avoir été déposées sur les feuilles de plants sources pour acquisition.

Un taux de mortalité d'environ 50% a été observé à la fin des étapes d'acquisition et d'inoculation pour les températures les plus faibles : 22 et 20°C. Pour les autres températures (24, 26, 28 et 30°C), en revanche, nous n'avons pas observé de mortalité des larves ce qui laisse à penser qu'elles se sont bien adaptées à leur nouveau support d'alimentation.

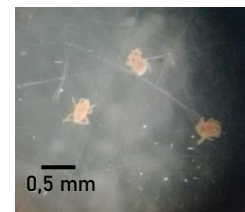


Figure 24 : Cochenilles stade L1 mortes après jeûne, loupe binoculaire 10x0,5x2 (Photo : Cailleaud, 2021)

Le taux de mortalité était peut-être dû à une adaptation plus difficile aux faibles températures comme 20 ou 22°C de la part des cochenilles. On peut donc supposer une meilleure adaptation et acclimatation des cochenilles pour les températures plus élevées telles que 28 ou 30°C.

	Longueur moyenne des germes	Largeurs moyenne des fèves	Longueurs moyenne des fèves	Pourcentage de germe nécrosé	Pourcentage de fèves avec déveppement de moisissure
LOT n°1 (26°C)	1,56	14,35	15,59	0	0
LOT n°2 (28°C)	2,71	11,67	20,26	77,27	22,73
LOT n°3 (30°C)	4,17	12,27	21,07	22,73	0
LOT n°4 (24°C)	1,80	14,00	24,14	31,82	0
LOT n°5 (22°C)	2,37	14,25	22,80	0	0
LOT n°6 (20°C)	1,17	13,73	25,92	0	0

Tableau 2 : Résultats de la prégermination des fèves

L'étape de prégermination a eu un résultat différent (nécrose du germe, moisissure de la fève) pour chaque fève, les lots constitués (dont les données sont dans le tableau 1) nous ont permis d'homogénéiser les fèves utilisées pour l'inoculation. Grâce à la réalisation de cette étape, nous savons que les fèves, même à l'intérieur de l'armoire climatique, doivent toujours être mise en contact avec un support humide pour éviter la nécrose du germe.

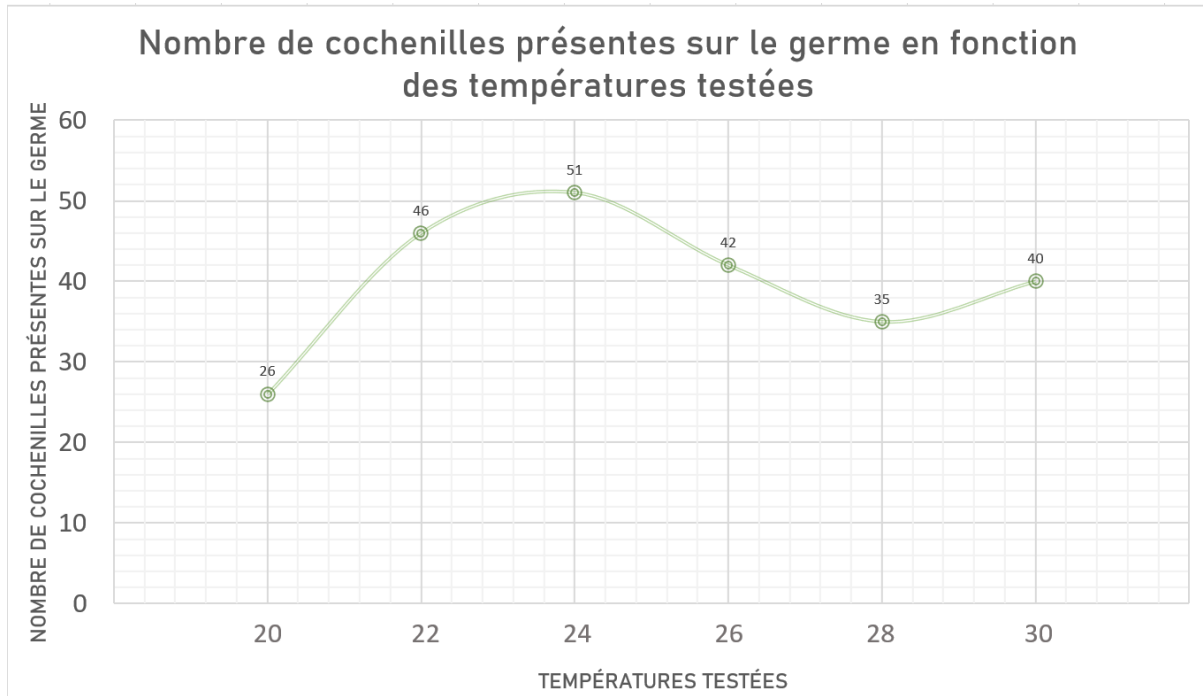


Figure 25 : Nuage de points renseignant sur le nombre de cochenilles présentes sur les germes de fèves à la fin de l'inoculation en fonction des températures testées

A la fin de l'inoculation, les données recueillies sur le nombre de cochenilles présentes sur le germe des fèves nous ont permis de dresser le graphique ci-dessus (cf figure 24). Nous pouvons constater que la température la plus faible (20°C) présente un nombre de cochenilles accrochées sur le germe 1,5 fois inférieur au nombre de cochenilles présentes sur le germe de la plus haute température testées (30°C). On constate que le nombre de cochenilles présentes sur les germes double entre les expérimentations à 20°C (nombre minimal de cochenilles présentes sur le germe) et à 24°C, où le nombre atteint son maximum, puis ce nombre diminue jusqu'à 28°C pour finir par augmenter de nouveau à 30°C. Le nombre de cochenilles présentes sur les germes montrerait une température potentiellement optimale de fixation au germe, de 24°C.

Avec ces résultats, on s'attend à ce que le taux de transmission des cochenilles testées à une température de 20°C soit inférieur à celui de la température de 30°C. En revanche, la transmission ayant eu lieu à la température de 24°C se verrait la plus performante, avec un nombre de cochenilles accrochées au germe 2 fois plus important que la température présentant le nombre de cochenilles accrochées le moins élevé.

3.3 Analyse des résultats de transmission

En se basant uniquement sur les résultats visibles sur les feuilles des jeunes plantules, nous avons constaté que les jeunes cacaoyers ne comportent aucun symptôme visible de la maladie virale du swollen shoot, Nous avons pour cela procédé à une détection par PCR.

Les échantillons D (sur le gel n°1) correspondent à la température testée de 26°C, les échantillons E, à la température testée de 28°C et les échantillons F à la température testée de 30°C (sur le gel n°2). MT est le marqueur de taille moléculaire utilisé pour l'électrophorèse et T- correspond au témoin négatif qui est de l'eau distillée. Les échantillons (T1+ et T2+) présents sur le gel n°2 correspondent à des témoins positifs (feuilles symptomatiques « positives » extraites précédemment).

La détection par PCR nous a permis d'obtenir les résultats ci-dessous.

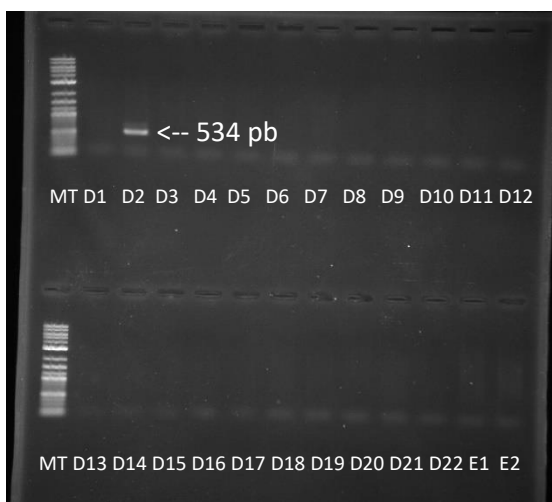


Figure 26 : Gel n°1 Electrophorèse (Muller, 2021)

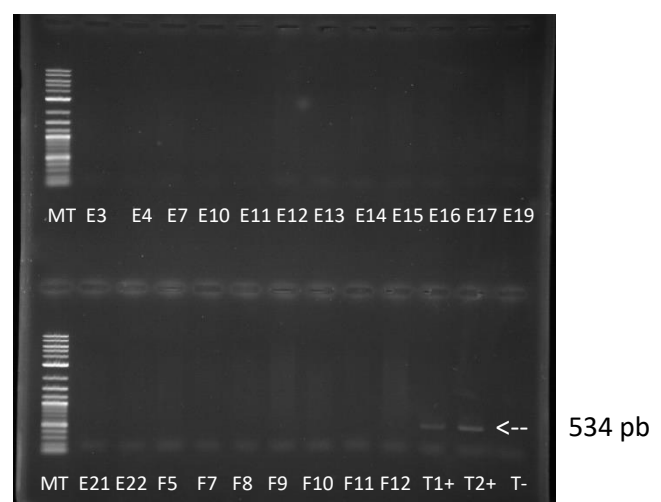


Figure 27 : Gel n°2 Electrophorèse (Muller, 2021)

Malgré la faible intensité des bandes observées pour les deux témoins positifs, on peut visualiser une bande correspondant au fragment amplifié à la taille attendue de 534 pb (paires de bases) sur la piste de l'échantillon D2 sur le gel n°1 (cf figure 26).

Ce résultat montre la présence du virus dans l'échantillon D2 qui correspond à la première température testée de 26°C, à la date du 5 mai 2021.

Grâce à la détection par PCR, nous avons détecté la présence du virus dans un des plants issus du premier essai de transmission (26°C). Cela veut donc dire que la transmission du virus des plants sources aux fèves par la *P.citri* a bien fonctionné. Le virus mettrait donc plus d'un mois à être détectable dans les jeunes feuilles (inoculation réalisée le 05/05 et PCR réalisée le 10/06) ce qui peut expliquer que rien n'est encore visible sur les autres essais de température. Nous savons de plus que le CSSV peut être réparti de manière hétérogène dans la plante, on ne peut donc pas exclure le fait que certaines feuilles de la plantule ne contiennent pas le virus (non publié). Il faudra continuer les observations et renouveler plus tard la détection par PCR pour pouvoir conclure sur ces expérimentations.

Aussi, durant les manipulations, le matériel utilisé et les changements fréquents de température ont eu des conséquences. Nous savons désormais que les « clips-cages » utilisées n'empêchent pas la fuite de cochenilles pendant la période d'acquisition. Nous savons également que les températures trop basses (entre 22 et 20°C) engendrent un taux de mortalité important durant l'entièreté des manipulations de transmission. Certains plants sources se sont en outre retrouvés très affaiblis à la fin des manipulations de transmission.

De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour pouvoir conclure sur la réussite des essais de transmission réalisés sur les trois premières températures. Pour commencer, il y a la provenance et l'espèce de cochenilles farineuses utilisées dans ces expériences. En effet, les cochenilles farineuses viennent de Corse et non de Côte d'Ivoire ou du Ghana, elles se nourrissent uniquement sur citrus et non sur cacaoyer. Le passage de la pomme de terre à la feuille de cacaoyer pourrait donc être un facteur empêchant l'acquisition et la transmission du CSSV des cacaoyers vers les fèves prégermées. Les conditions environnementales jouent donc un rôle important dans la performance de transmission de l'insecte (plante hôte utilisée, climat). D'après Cox et Freeston, il est primordial d'identifier correctement les cochenilles farineuses qui infestent le cacao, car l'efficacité de ces insectes en tant que vecteurs de virus, varie en fonction de l'espèce et des conditions environnementales.

Nous savons également que plusieurs espèces de cochenilles farineuses transmettent plus ou moins bien le virus du swollen shoot (forme « Agou 1 » du Togo) comme *Ferrisia Virgata* ou encore *Pseudococcus longispinus* (Targ. Tozz.). D'après les observations de Dale (1957), l'espèce *Planococcus kenyae* serait testée positive à la vection du virus de la forme « Agou 1 » au Togo et de la forme « New Juaben » au Ghana. Cette espèce pourrait donc être une espèce alternative à *P.citri* dans des essais de transmission futurs.

Conclusion

Les premiers résultats nous permettent de conclure que le protocole établi a permis de réaliser avec succès, pour au moins un échantillon, le processus complet de transmission du virus par les insectes vecteurs choisis, des plants sources infectés vers les fèves de cacao germées. Cependant, l'évaluation globale des ne pourra être faite que lorsque l'on aura accès à la totalité des résultats (PCR réalisées sur l'ensemble des échantillons des températures testées après des délais de plus d'un mois). Le taux de transmission s'élève à 4,5% (un échantillon positif pour 22 essais) pour le premier essai un mois après inoculation.

La mise en place de l'élevage a été un succès, en nous fournissant les cochenilles de stade L1 nécessaires aux manipulations. Cependant, nous ne sommes pas réellement certains de l'efficacité de ce vecteur, compte tenu de son origine. Il faudrait donc renouveler les essais de transmission en prenant comme insecte vecteur *Planococcus citri* ou une autre espèce comme *P.kenyae* ou *Formicococcus njalensis* venant de Côte d'Ivoire ou du Ghana afin de démontrer l'efficacité du vecteur ayant vécu sur le cacaoyer lors de ce test.

Les températures extrêmes auraient un effet répressif sur la fixation des cochenilles au germe des fèves et la température optimale serait de 24°C. Néanmoins cette hypothèse reste tout de même à vérifier lorsqu'on aura obtenu l'ensemble des résultats des manipulations de transmission et qu'on pourra comparer les taux de transmission et prouver le réel impact de la température sur la vexion du CSSV par *P.citri* sur le cacaoyer.

Bilan

Le protocole des manipulations de transmission a été élaboré avec l'aide de nombreuses publications de recherche sur le sujet (CSSV, cochenilles vectrices, etc.) pour permettre de mettre en place des manipulations, ce qui m'a permis de bien visualiser l'entièreté de la problématique (vection, température etc.).



Mon stage au CIRAD de Montpellier a été très instructif. J'ai eu la chance de participer en grande partie à la mise en place et à la réalisation d'une série d'essais, ce qui m'a donné l'occasion de prendre des initiatives et faire preuve d'adaptation. La gestion du matériel a été un réel challenge pour réussir à coordonner les envois du matériel biologique avec l'avancée progressive des manipulations. Ce stage m'a permis de me conforter dans mes choix d'avenirs : poursuivre mes études dans le domaine de la production végétale des plantes méditerranéennes et tropicales.

Les manipulations réalisées ont permis à l'équipe de recherche d'obtenir des résultats sur la mise en place d'un élevage de cochenilles vectrices, la mise en place et la mise en œuvre d'un protocole de transmission en France et l'analyse des résultats obtenus. De plus, la mise en place de l'élevage et la création d'une nouvelle dynamique sur cette nouvelle thématique a fédéré diverses compétences, entomologie, virologie, ce qui va permettre de continuer les expérimentations en se basant sur ce que nous avons développé pendant ce stage. Les résultats vont pouvoir permettre à l'équipe de poursuivre les recherches en améliorant ces techniques afin de répondre à de nombreuses questions sur le CSSV, causant actuellement de nombreux dégâts en Côte d'Ivoire.

Liste des compétences

Activités et compétences de base en Génie Biologique – Code GB

GB1. Réalisation et conditionnement des prélèvements	- Réaliser les prélèvements en fonction des règles en vigueur et du type d'échantillons
GB2. Réception et traitement des échantillons	- Vérifier la conformité des échantillons et mettre en œuvre leur traitement pré-analytique
GB3. Réalisation des analyses	- Identifier et analyser les risques associés aux analyses et appliquer les mesures préventives - Organiser l'espace de travail selon les règles d'hygiène et de sécurité des techniques mises en œuvre
GB4. Mise en œuvre d'une production	- Préparer et démarrer la production
GB6. Planification des activités et gestion des ressources	- Participer à un projet, le gérer
GB9. Veille professionnelle et amélioration de ses pratiques	- Identifier et analyser les ressources documentaires (publications, normes, textes réglementaires) et les bases de données
GB12. Communication et information	- Coopérer avec les acteurs, réseaux et structures

Activités et compétences spécifiques à l'option Agronomie – Code A

A1. Production végétale	- Assurer la conduite d'un élevage - Optimiser les conditions d'élevage (infrastructure, alimentation, hygiène) en prenant compte les démarches Qualité et Développement Durable - Manipuler les animaux - Utiliser les outils les plus adaptés à la conduite d'une culture ou d'un élevage
A4. Réalisation d'expérimentations en centre technique	- Contribuer à un plan d'expériences, de la conception à la récolte des données - Traiter et interpréter les données à l'aide d'outils statistiques adaptés

Références bibliographiques

Publications et ouvrages de référence

- Andres C. et al. (2018) Agroforestry systems can mitigate the severity of cocoa swollen shoot virus disease. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 252: 83-92.
- Ameyaw, G., Dzahini-Obiatey, H., & Domfeh, O. (2014). Perspectives on cocoa swollen shoot virus disease (CSSVD) management in Ghana. *Crop Protection*, 65, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.001>
- Aka RA et al. (2020) Cocoa swollen shoot disease in Côte d'Ivoire: history of expansion from 2008 to 2016. *International Journal of Sciences* 9: 52-60.
- Bigger, M. (1981). The relative abundance of the mealybug vectors (Hemiptera : Coccidae and Pseudococcidae) of Cocoa swollen shoot disease in Ghana. *Bulletin of Entomological Research*, 71(3), 435-448. <https://doi.org/10.1017/s0007485300008464>
- Braudeau, J. (1969). *le cacaoyer, techniques agricoles et productions tropicales* (1^{re} éd., Vol. 17). G.-P. Maisonneuve et Larose.
- CIRAD & Nestlé France. (1999). *Les mondes du cacao*. CIRAD.
- DUFOUR, B. (1988). Utilisation d'une méthode de transmission pour la caractérisation des formes togolaises de virus du swollen shoot du cacaoyer. *Café Cacao Thé*, 32(3), 219-228.
- Jacquot, E., Hagen, L. S., Michler, P., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., Keller, M., Jacquemond, M., & Yot, P. (1999). In situ localization of cacao swollen shoot virus in agroinfected *Theobroma cacao*. *Archives of Virology*, 144(2), 259-271. <https://doi.org/10.1007/s007050050502>
- Kaur Gill, H., Goyal, G., & Gillett-Kaufman, J. (2019, 10 mars). *EENY-537/IN947: Citrus Mealybug Planococcus citri (Risso) (Insecta : Hemiptera : Pseudococcidae)*. <http://SfYL.Ifas.Ufl.Edu/>. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/in947>
- Kouakou, K., Kébé, B. I., Kouassi, N., Aké, S., Cilas, C., & Muller, E. (2012). Geographical Distribution of Cacao swollen shoot virus Molecular Variability in Côte d'Ivoire. *Plant Disease*, 96(10), 1445-1450. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-11-0749-re>
- Muller, E. (2021) Cacao Swollen Shoot Virus (Caulimoviridae). In: Bamford, D.H. and Zuckerman, M. (eds.) *Encyclopedia of Virology*, 4th Edition, vol. 3, pp. 274-284. Oxford: Academic Press.
- Muller, E. et al. (2018) Next generation sequencing elucidates cacao badnavirus diversity and reveals the existence of more than ten viral species. *Virus Research* 244: 235-251.
- Oro, F. Z., Bonnot, F., Ngo-Bieng, M. A., Delaitre, E., Dufour, B. P., Ametefe, K. E., Mississo, E., Wegbe, K., Muller, E., & Cilas, C. (2012). Spatiotemporal pattern analysis of Cacao swollen

shoot virusin experimental plots in Togo. *Plant Pathology*, 61(6), 10431051.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02589.x>

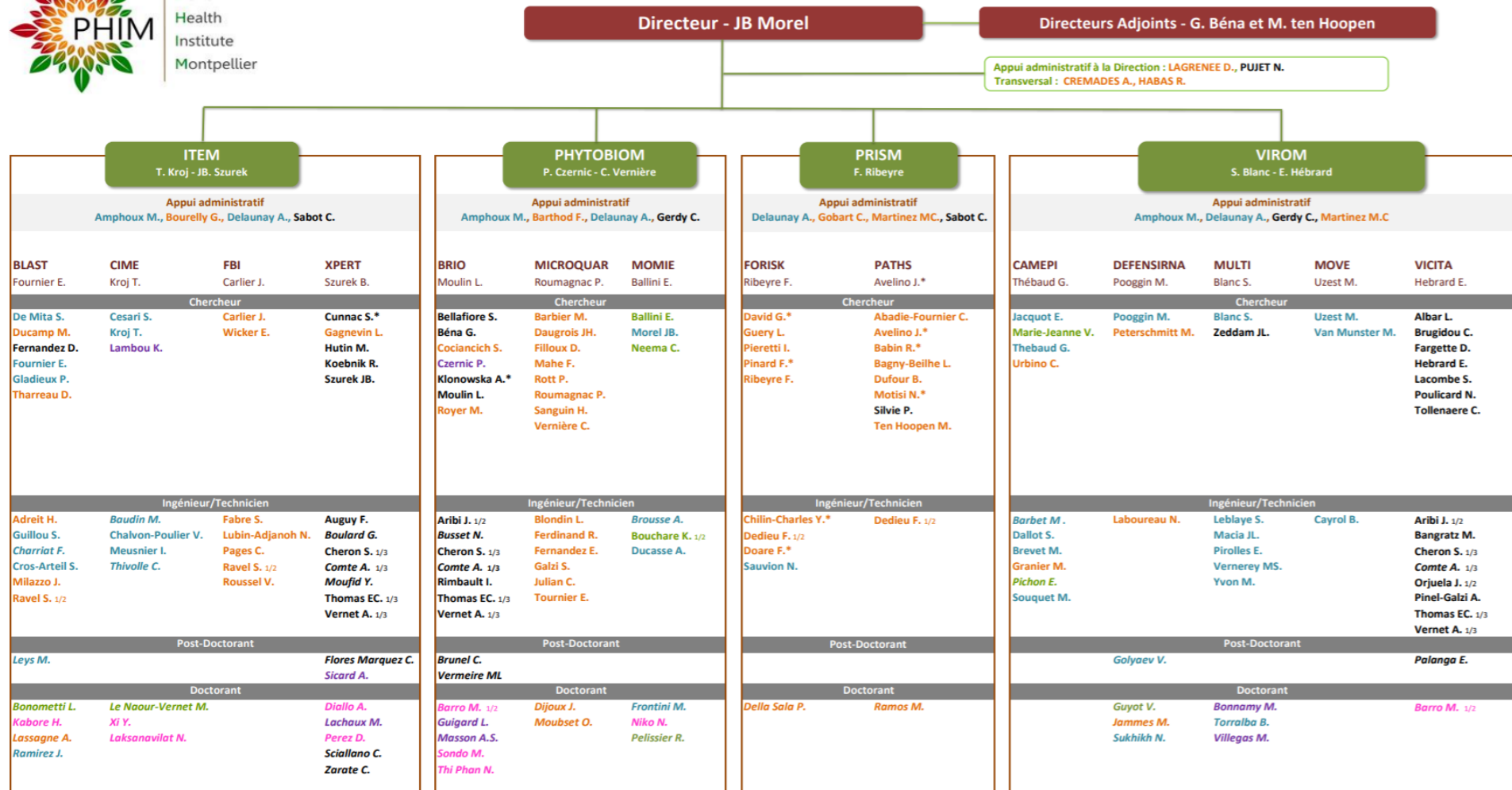
Roivainen O. (1976) Transmission of cocoa viruses by mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 48: 203-304.

ROIVAINEN, O. (1973). Viruses and Coccoidea. *Frontiers of Biology*, 31(Chapter 23).

Sauvion, N., Calatayud, P., Thiéry, D., & Marion-Poll, F. (2013). *Interactions insectes-plantes (QUAE GIE) (French Edition)*. QUAE.

Wetten A., Campbell C. & Allainguillaume J. (2016). High-resolution melt and morphological analyses of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from cacao: tools for the control of Cacao swollen shoot virus spread. *Pest Management Science*, 72, 527-533.

ANNEXE 1 : ORGANIGRAMME UMR PHIM



Légende

	CIRAD		IRD
	INRAE		Univ .Montpellier
	L'institut Agro		Autre

NOM en italique : agent non permanent
* : agent hors métropole



ANNEXE 2 : ORGANISATION DES MANIPULATIONS DE TRANSMISSION

		MANIPULATIONS ANNULEES pas assez de cochenilles L1, planification d'une semaine type de manipulations	MANIPULATIONS EFFECTUEES L1 très mobile + abandon du jeûne car 100% mortalité	MANIPULATIONS EFFECTUEES Présence d'acariens dans l'élevage	MANIPULATIONS EFFECTUEES Présence d'acariens dans l'élevage	MANIPULATIONS ANNULEES Fèves du 3ème envoi non germée et 4ème envoi non reçu	MANIPULATIONS EFFECTUEES Essais de transmission avec 10 et 20 cochenilles sur 3 fèves	MANIPULATIONS EFFECTUEES Fin des manipulations
		du 26/04 au 02/05	du 03/05 au 09/05	du 10/05 au 16/05	du 17/05 au 23/05	du 24/05 au 30/05	du 31/05 au 06/06	du 07/06 au 13/06
Cochenilles	Ac = Acclimatation	51 heures	Week-end	-	-	-	-	-
	J = Jeune	24 heures	22 heures	-	-	-	-	-
	A = Acquisition	24 heures	24 heures (A1)	24 heures (A2)	24 heures (A3)	24 heures (A5)	24 heures (A5)	-
	A = Acquisition				24 heures (A4)	24 heures (A6)	24 heures (A6)	-
	Ic = Inoculation	56 heures	48 heures (Ic1)	48 heures (Ic2)	48 heures (Ic3)	48 heures (Ic5)	48 heures (Ic5)	-
	Ic = Inoculation				88 heures (Ic4)	48 heures (Ic6)	64 heures (Ic6)	-
	In = Incubation		In1 (semis du 07/05/2021)	In2 (semis du 14/05/2021)	In3 (semis du 20/05/2021)	In4 (semis du 25/05/2021)	In5 (semis du 03/06/2021)	In6 (semis du 07/06/2021)
Fèves	Ger = prégermination	-	9 jours	9 jours	Entre 7 et 15 jours et 10 jours	-	9 jours et 5 jours	-
		du 26/04 au 02/05	du 03/05 au 09/05	du 10/05 au 16/05	du 17/05 au 23/05	du 24/05 au 30/05	du 31/05 au 06/06	du 07/06 au 13/06
LUNDI	8h		Ac					
	9h							
	10h						Envoi 5 cabosses (x4)	In6 (semis du 07/06/2021)
	11h	Envoi 1 cabosses (x3)	Envoi 2 cabosses (x3)					
	12h				A3			
	13h							
	14h						A5	
	15h	Ac						
	16h							
	17h		J					
	18h							
	19h							
	Nuit							
	MARDI	8h						
9h						In4 (semis du 25/05/2021)		
10h				Envoi 3 cabosses (x3)				
11h						A5		
12h					Ic3 (avec mélange envoi 2 et 3)			
13h								
14h							Ic5 (avec envoi 4)	
15h			A1	A2				
16h								
17h								
18h								
19h								
Nuit								
MERCREDI		8h					Envoi 4 cabosses (x4)	
	9h							
	10h							
	11h					Ic5 (avec envoi 3)		
	12h							
	13h							
	14h							
	15h		Ic1 (avec envoi 1)	Ic2 (avec envoi 2)				
	16h							
	17h							
	18h	J						
	19h							
	Nuit							

Tableau 2 : Planning des manipulations de transmission et des réceptions de cabosses

ANNEXE 2 bis : ORGANISATION DES MANIPULATIONS DE TRANSMISSION

		du 26/04 au 02/05	du 03/05 au 09/05	du 10/05 au 16/05	du 17/05 au 23/05	du 24/05 au 30/05	du 31/05 au 06/06	du 07/06 au 13/06
JEUDI	8h							
	9h							
	10h							
	11h							
	12h				In3 (semis du 20/05/2021)			
	13h							
	14h						In5 (semis du 03/06/2021)	
	15h							
	16h							
	17h					A4		
	18h	A						A6
	19h							
Nuit								
VENDREDI	8h							
	9h							
	10h							
	11h					In5 (semis du 28/05/2021)		
	12h					A6		
	13h							
	14h							
	15h		In1 (semis du 07/05/2021)	In2 (semis du 14/05/2021)				
	16h							
	17h					Ic4 (avec envoi 3)		
	18h	Ic						Ic6 (avec envoi 5)
	19h							
Nuit								
SAMEDI	8h							
	9h							
	10h							
	11h							
	12h						Ic6 (avec mélange envoi 4)	
	13h							
	14h							
	15h							
	16h							
	17h							
	18h							
	19h							
Nuit								

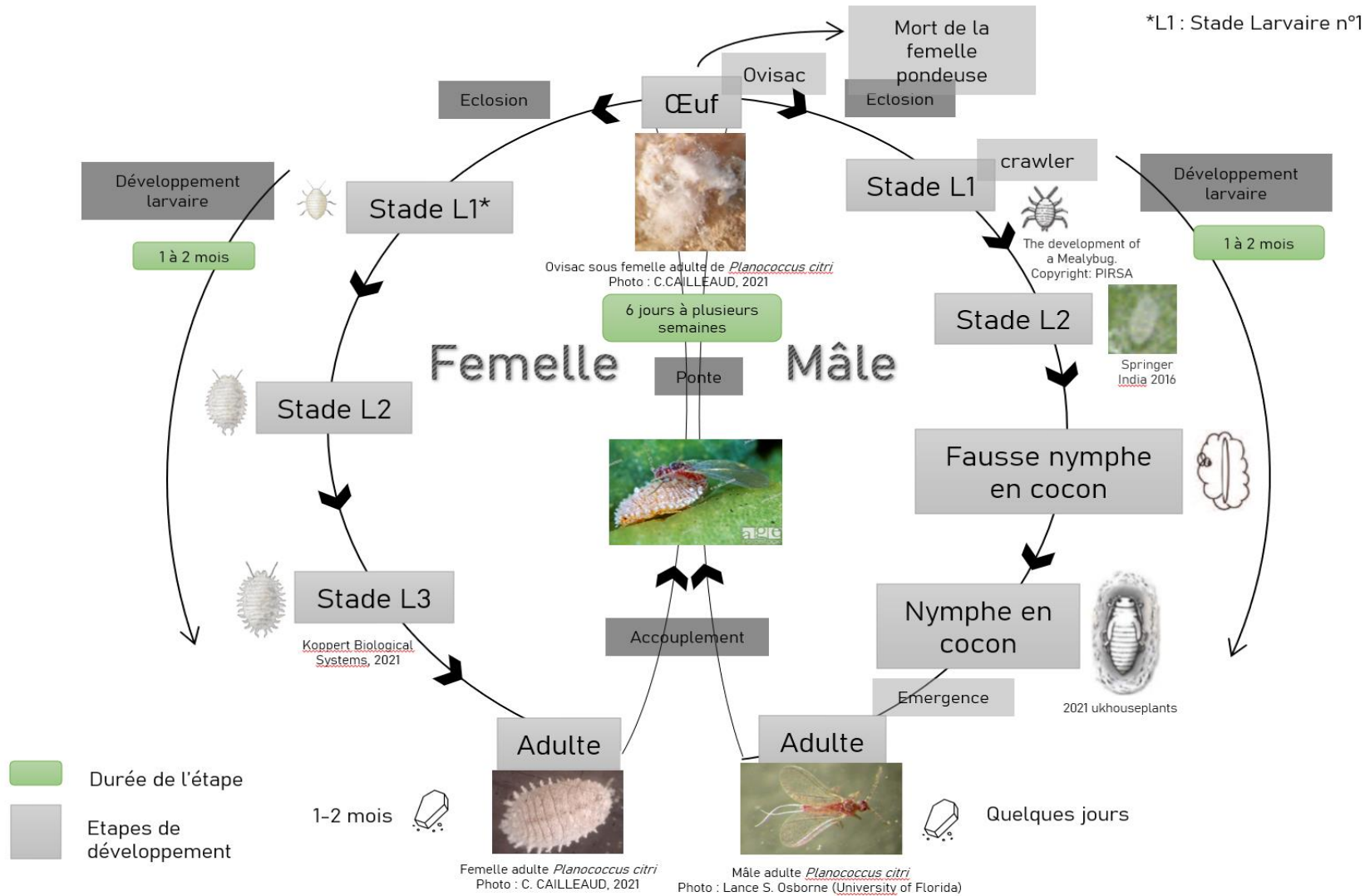
Tableau 2 bis : Planning des manipulations de transmission et des réceptions de cabosses

Acquisition + Inoculation			
Semaine	Température (en°C)	Nombre de fèves	Nombre de cochenilles
du 03/05 au 09/05	26	22	100
du 10/05 au 16/05	28	22	100
du 17/05 au 23/05	24	22	100
du 17/05 au 23/06	30	22	100
du 24/05 au 30/05	22	22	100
du 31/05 au 06/06	20	22	100
	Total	132	600

Tableau 3 : total de productions (cochenilles et fèves) nécessaire à l'ensemble des manipulations de transmission

ANNEXE 3 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE *PLANOCOCCUS CITRI*

Cycle de développement de *Planococcus citri*



ANNEXE 4 : PHOTOTÈQUE DES ÉTAPES PRÉLIMINAIRES



Cabosses du premier envoi



Cabosse ouverte



Ensemble des fèves du cinquième envoi (début prégermination)



Fèves du premier envoi, 3 cabosses différentes



Boîtes « beurrier » du premier envoi de cochenilles



Cellule climatique avec cacaoyers sains, plants sources et semis (T°C = 25±2°C et HR = 70±10%)



Armoire climatique BINDER pour essais de transmission (T°C = [20 ; 30]°C, HR = 70±10%, ventilation = 10%)

ANNEXE 5 : PHOTOTHÈQUE DES EXPÉRIENCES



Plants sources après acquisition (clips-cage avec tuteurs visibles)



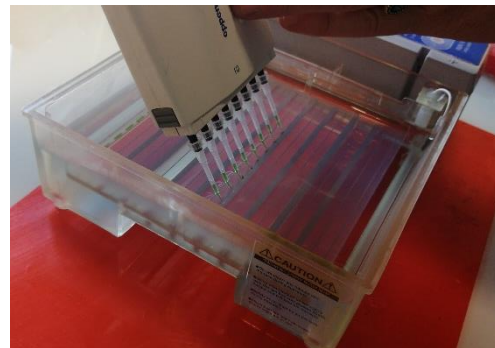
Inoculation terminée
(fèves prégermées dans tubes plastique avec couvercle moustiquaire)



Début d'incubation (essais 26°C et 28°C)



Appareil PCR utilisé



Préparation électrophorèse : dépôt des échantillons dans les puits avec pipettes multicanaux



Broyeur GenoGrinder

ANNEXE 6 : PHOTOTHÈQUE DES SEMIS

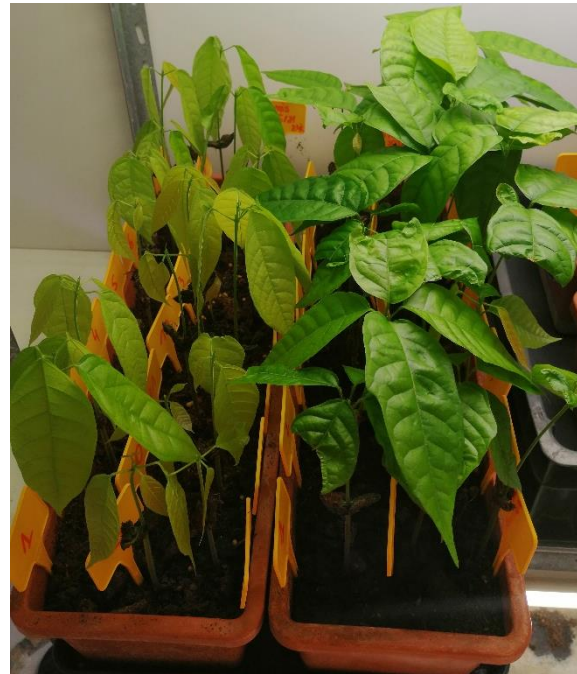
20°C

22°C



24°C

30°C



26°C



28°C



Résumé

La maladie du cacao swollen shoot qui attaque les cacaoyers en Afrique de l'Ouest depuis une centaine d'année est transmise par plusieurs espèces d'insectes vecteurs du groupe des cochenilles farineuses. Cette maladie considérée comme la principale maladie virale du cacao est aussi l'une des plus importantes maladies d'Afrique de l'Ouest ayant un impact sur la production de cacao car elle est présente dans les principaux bassins de production des deux premiers pays producteurs, Ghana et Côte d'Ivoire. Les objectifs spécifiques de ce stage consistaient à mettre en place un protocole de transmission de la maladie basé sur les données bibliographiques, à établir un élevage de *Planococcus citri* (cochenilles vectrices) et à étudier grâce à ces dispositifs l'impact de la température sur la vection de la maladie sur les cacaoyers par *P.citri*. Les premiers résultats ont démontré la fiabilité du protocole mais tous les résultats ne sont malheureusement pas encore disponibles pour conclure clairement sur l'impact de la température sur la vection du CSSV au cacaoyer par la cochenille farineuse *P.citri*. Un protocole est néanmoins établi pour pouvoir reproduire ces expérimentations sur un matériel végétal différent et avec de nouvelles populations de cochenilles.

Abstract

Background : The cocoa swollen shoot disease that has been attacking cocoa trees in West Africa for about a hundred years is transmitted by several insect vectors species (Pseudococcidae). This disease considered as the main viral disease of cocoa is also one of the most important diseases in West Africa with an impact on cocoa production because it is present in the main production basins of the two main producing countries, Ghana and Ivory Coast.

Presentation : The specific objectives of this training course were to set up a disease transmission protocol based on bibliographic data, to establish a breeding of *Planococcus citri* (mealybug vectors) and to study, thanks to these devices, the impact of the temperature on the disease transmission on cocoa trees by *P.citri*.

Conclusion : The first results demonstrated the reliability of the protocol but unfortunately all the results are not yet available to conclude clearly on the impact of temperature on the transmission of CSSV to cocoa by the mealybug *P.citri*. A protocol is nevertheless established to be able to reproduce these experiments on a different plant material and with new populations of mealybugs.

Keywords

CIRAD, Swollen shoot virus, Cochenilles farineuses, Cacao, *Planococcus citri*, Badnavirus, transmission, vection, température