

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER
CENTRE D'ADIPODOUME
B.P. V-51 - ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Virologie

RAPPORT D'ELEVE 2^e Année

PREMIERE PARTIE

MISE AU POINT D'UN TEST IMMUNO-ENZYMATIQUE, ELISA, POUR
LA DÉTECTION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU MANIOC

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS DE TRANSMISSION D'UN RHABDOVIRUS DU BLÉ PAR LE
DELPHACIDE *LAODELPHAX STRIATELLUS* FALL.

par

Denis FARGETTE

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIOPODOUME

B.P. V-51 - ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Virologie

RAPPORT D'ELEVE

MISE AU POINT D'UN TEST IMMUNO-ENZYMATIQUE, ELISA,
POUR LA DÉTECTION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU MANIOC

par

Denis FARGETTE

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	2
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	4
- Transmission mécanique	
- Purification	
- Sérologie	
- Extraction des Ig 6 à partir de jaune d'oeuf	
- Concentration et purification des Ig 6	
- Test ELISA.	
<u>RÉSULTATS</u>	7
- Purification	
- Sérologie	
- Sensibilité des Ig 6	
- Réduction du bruit de fond	
- Détection du virus dans les jus de plante	
- Extraction du virus à partir de manioc	
- Détection du virus en ELISA par immersion de pastilles ou de disques de feuilles	
- Utilisation d'un homogénéiseur.	
<u>DISCUSSION</u>	10

INTRODUCTION

Le manioc est cultivé pour ses racines tubérisées (*Manihot esculenta* Crantz ; famille des Euphorbiacées) qui entrent pour une grande part dans l'alimentation quotidienne de nombreuses populations, surtout africaines. C'est une plante riche en amidon. Elle est consommée soit directement sous forme de "manioc vert", soit sous forme de farine. Dans l'industrie, le manioc sert à la préparation de l'amidon, du tapioca, de colle ... Enfin le manioc est utilisé pour l'alimentation animale soit en vert, soit en farine.

C'est un arbrisseau de 4 à 5 m dont la tige se ramifie par trichotomie, les racines tubéreuses et fasciculées sont riches en amidon et se conservent longtemps en bon état dans le sol et constituent ainsi une bonne production de soudure. Les fleurs en grappe avortent souvent, aussi la multiplication se fait-elle par bouturage. Le manioc est une plante de zone tropicale humide à grande faculté d'adaptation tant pour le climat que pour le sol (Memento de l'Agronome, 1981). Les rendements obtenus dans les champs tournent autour de 5 à 10 tonnes à l'ha, alors qu'en station des rendements de 60 tonnes à l'ha peuvent être obtenus (DIZES, 1975).

Les déprédateurs et les maladies sont des facteurs importants qui limitent la production. La mosaïque du manioc spécialement peut provoquer des pertes qui varient de 20 à 90% (BOCK et GUTHIE, 1977). Cette maladie a été décrite dès 1938 (STONY et NICHOLS, 1938) sur tout le continent africain, ainsi qu'à Madagascar, et une affection présentant les mêmes caractéristiques a été observée en Malaisie, en Indonésie et en Inde (ALAGIANAGALINGAM, and RAMAKRISHNAN, 1966). Le nom mosaïque recouvre non seulement le système de mosaïque, mais aussi un synchome plus complexe incluant des déformations, une frisolée et un rabougrissement. L'agent causal de cette maladie est resté longtemps inconnu et est, à l'heure actuelle, encore incertain. Récemment un gemini-virus (GOODMAN, 1981) a été isolé et purifié à partir de plants de tabac auxquels a été inoculé un extrait de *M. esculenta* atteint de la maladie de la mosaïque (BOCK and GUTHIE, 1978, BOCK et al., 1978, WALTER, 1981). Cependant, les transmissions retours à des maniocs sains de virus purifié ou d'extraits de plante n'ayant abouti, on ne peut affirmer avec certitude que ce gemini-virus est l'agent ou l'unique agent causal de la maladie. La mosaïque du manioc se propage par mouches blanches (*Bemissia tabacci*) (COSTA, 1976) et par bouturage à partir de pieds malades.

Etant donné l'importance des dégâts qu'elle occasionne cette maladie est actuellement l'objet de programmes de recherche prioritaires dans divers laboratoires en Afrique. A Adiopodoumé (Côte d'Ivoire) différents aspects ont été abordés ou sont en cours d'étude :

- les caractéristiques de la transmission de l'agent causal par *Bemissia tabacci* (DUBERN, 1979),

- recherche et caractérisation de l'agent causal (WALTER, 1981),
- travail en champ (FAUQUET et THOUVENEL, 1980 ; 1981).
 - . influence des pratiques culturelles (date de plantation, brise vent) sur le taux de contamination naturelle
 - . développement de la maladie dans différents biotopes (Adiopodoumé, zone côtière ; Toumodi, 250 km au Nord d'Abidjan),
 - . comportement de différentes variétés dans le cadre de la recherche de variétés résistantes ou tolérantes,
 - . sélection de matériel sain.

Actuellement encore, on dispose de peu d'informations sur l'épidémiologie de cette maladie. En particulier, les sources d'inoculum et les facteurs déterminant la dynamique de populations et le mouvement des aleurodes vecteurs ne sont pas connus. Pour pallier ces lacunes, des techniques de piégeage sont actuellement à l'étude (pièges à eau ; pièges à glue ; sacs deplastique).

D'autre part, les difficultés de transmission mécanique du virus, et les échecs de transmission retour sur manioc limitent l'étude des réservoirs de la mosaïque du manioc. Un test sensible, reproductible, applicable à grande échelle permettrait de compléter la gamme d'hôtes et d'entreprendre une recherche systématique des réservoirs en champ.

Aussi le premier objectif du stage entrepris en janvier 1982 a-t-il été la mise au point d'un test immuno-enzymatique, le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

La sensibilité des réactions immunologiques est améliorée en couplant des enzymes à un anticorps. La méthode ELISA a été utilisée par la suite pour détecter une large gamme d'antigènes. Plusieurs enzymes ont été utilisées pour marquer les anticorps ; elles ont été couplées suivant différents procédés (VOLLER et *al.*, 1977). Pour la détection des virus de plantes, les anticorps sont habituellement couplés à la phosphatase alcaline à l'aide de la glutaraldéhyde par la méthode "en un temps" (CLARK et ADAMS, 1977 ; BAN-JOSEPH et GAINSEY, 1981).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Transmission mécanique

Des jeunes feuilles de manioc (*Manihot esculenta*, Crantz, ont été broyées au mortier dans différents milieux (phosphate de sodium, phosphate de potassium, en présence de différents anti-oxydants) chlorhydrate de cystéine (M/100), sodium diethyldithiocarbamate (M/100), 2 mercapto éthanol (M/100). Les extraits obtenus ont été inoculés sur les feuilles de plants de *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. xedwardsonii* (hybride de Christie), *N. tabacum* Sansum NN préalablement saupoudrées de carborundum. Les plantes ont été conservées à l'abri des insectes en serre "insect proof".

Purification

Différentes méthodes (de purification) ont été essayées pour purifier le virus, soit à partir de manioc, soit à partir de tabac.

- Matériel de départ - *N. benthamiana*
- *N. tabacum* Sansum NN
- *N. xedwardsonii*
- différents temps après inoculation
 - jeunes feuilles (bouquet terminal),
feuilles âgées ; tiges ; repousses après
première récolte.
- Extraction - tampon citrate, phosphate, borate (de
sodium ou de potassium), à différents pH
et à différentes molarités.
- antioxydants mercaptoéthanol, acide thio-
glycolique, EDTA.
- Classification - chloroforme (1V, 2V, 3V ; par rapport au
poids de la feuille).
- butanol
 - chloroforme butanol (90-10%)
 - sulfate d'ammonium 15%
 - triton X100 (2%)
 - acidification à différents pH
- Concentration - polyéthylène glycol (PEG) 10%
- polyéthylène glycol 10%, Na Cl 6%
 - sulfate d'ammonium 30%
 - ultra-centrifugation (différents tampons
de resuspension)
 - gradients de saccharose.

Une méthode de purification proche de celle établie par WALTER (1981) a été retenue. 100 gr de jeunes feuilles de *N. benthamiana* sont broyées 3 à 4 semaines après inoculation en présence de 400 ml de borate de potassium (0.2 M, pH : 8.2), acide thioglycolique 1%, EDTA, 4 m vs, polyvinyl pyrrolidone (PVP) 0,5%. L'homogénat est clarifié par addition de 200 ml de chloroforme, puis centrifugé

dix minutes à 10.000 g. On ajoute 30 gr de sulfate d'ammonium pour 100 ml de la phase aqueuse. Après 30 minutes à 4°C le précipité est recueilli par centrifugation de 10 min à 10.000 g et est repris dans 200 ml du tampon de broyage dilué cinq fois. Après une centrifugation à basse vitesse le surnageant est ultra-centrifugé pendant 4 h à 100.000 g, à travers un coussin de saccharose à 20% le culot est repris dans 2 ml de tampon borate de potassium 0.05 M pH: 8.2. Après une centrifugation basse vitesse le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose borate 0.05 M, pH : 8.2 10-40%. On recueille la bande opalescente contenant les particules infectieuses au fractionneur de gradient Isco-modèle 640.

Sérologie

Deux lapins ont reçu chacun une série de huit injections, les premières en intra-veineuses les suivantes en intra-musculaires (VAN DER VEHEN et al., 1962), d'une suspension de virus purifié, passé ou non sur gradients. Chaque suspension avait une densité optique à 260 nm variant entre 1,000 et 2,000 unité D.O. Le virus était formolé (0,2%) et mélangé à un égal volume d'adjuvant incomplet de Freund pour les injections intra-musculaires. Le titre des serums prélevés a été mesuré par double diffusion en gel d'ogénèse (OUTCHERLONY, 1968) et par test ELISA.

2 poules ont reçu respectivement deux et trois injections en intra-musculaires de suspension de virus ayant une densité optique à 260 nm (Ig 6) de 2.000 à 5.000.

Extraction des immuno-globulines G à partir de jaune d'oeuf

(POLSON et al., 1980). Le jaune est séparé du blanc, lavé puis rompu (volume V). On ajoute 2V de phosphate de potassium 0,01 M pH 7,5 contenant 0.1 M de Na Cl et 0,01% (+ $1:10^{-4}$) d'acide de sodium. Après agitation pendant 1 h on dissout du PEG à la concentration de 3,5% (P/V). Après agitation (1 h), l'homogénat est centrifugé 10 min à 14000 g et le surnageant récolté. On ajoute alors du PEG jusqu'à une concentration de 12% (P/V). Après centrifugation 10 min à 14000 g les culots sont resuspendus dans le volume initial V de tampon, soumis à une deuxième précipitation au PEG (12% ; P/V), puis resuspendus après compactage dans la moitié du volume initial.

Purification et concentration des Ig 6 à partir de serums de lapins

Les Ig 6s sont préparées par demi-saturation au sulfate d'ammonium, suivie par une resuspension dans le tampon phosphate (PBS), pH 7.4, puis par 3 dialyses contre le PBS. Après filtration sur colonne de DE 22 cellulose la fraction "active" (max. 27,8, min. 25,0 rapport max/min > 2,5) est collectée. Les Ig 6 ajustées à 1 mg de protéine par millilitre (DO 280, 1400) sont conjuguées avec de la phosphatase alcaline (Type VII, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) dans un rapport enzyme / Ig 6 de 5/3 / P/P) par traitement avec 0,06% de glutaraldehyde (4 h à température ambiante). Après dialyse on ajoute de la serum albumine de boeuf 15 ng/ml) et l'on stocke à 5°C.

Test ELISA

200 μ l d'immuno-globulines (Ig G) à une concentration A de 10 μ g/ml dans du carbonate de sodium 0.05 M, pH : 9.6 sont laissées à incuber dans chaque cupule des plaques de polystyrène micro ELISA Titertek. Les cupules des bordures ne sont pas utilisées, mais remplies d'eau distillée pour stabiliser la température. Après incubation les plaques sont rincées 3 fois avec du PBS contenant 0.05% de tween (PBS Tween). Les extraits de plantes ou les solutions purifiées sont laissées à incuber 4 à 6 h à 37°C dans du PBS-Tween contenant 5% de PVP (PBS-Tween pour réagir dans les puits avec PVP) avec les IgG fixées. Après une nouvelle série de rinçages les globulines couplées à l'enzyme sont ajoutées et laissées à incuber pendant la nuit à 6°C pour réagir avec l'antigène fixé. Le conjugué est dilué (1:400) dans du PBS-Tween. PVP contenant 0,2% ovalbumine. Finalement, après une nouvelle série de rinçages, la réaction spécifique antigène-anticorps est mesurée en ajoutant 200 μ l de p. nitrophenyl phosphate à 1 mg/ml dans 10% de tampon diethanolamine à pH 9.8. L'absorbance à 405 nm de chaque cupule est mesurée grâce à un spectrophotomètre Titertek Multiscan.

RÉSULTATS

Purification

Le spectre d'absorption en UV du virus purifié présente un maximum à 260 nm et un minimum à 242 nm, le rapport E_{\max}/E_{\min} variant de 1.10 à 1.4 et le rapport E_{280}/E_{260} de 1.5 à 1.9. Après coloration à l'acétate d'uranyle on observe en microscopie électronique de nombreuses particules rondes souvent associées en doublets. Le rendement de cette purification est de moins de 1 mg pour 100 grammes de feuilles de *N. benthamiana*.

Sérologie

Les antisérums préparés à l'aide des préparations purifiées réagissent avec des préparations purifiées de CMV (DO : 1000 à 2000) et donnent des titres de 1/32 à 1/96 en tests de double diffusion en agarose. Les réactions aspécifiques, dues aux protéines de plante, sont observées jusqu'aux dilutions de 1/8 du serum. Des extraits bruts, ou clarifiés, de jus de tabac ou de manioc n'ont pas réagi, probablement à cause d'une concentration trop faible en virus ou à la présence d'inhibiteurs.

La figure (1) illustre les résultats obtenus en ELISA pour des dilutions en série des sérums 128 C et 131 C. Ce test permet à la fois un dosage du titre du sérum plus sensible et une économie d'immunoglobulines utilisées par ELISA. Ce test offre en outre une sensibilité plus grande et permet de discriminer des sérums présentant le même titre en double diffusion sur gel d'agarose (Tableau 1).

La figure (2) illustre les résultats obtenus par ELISA avec des concentrations en immuno-globulines du sérum 128 C dans la couverture de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et des dilutions du conjugué de 1 : 100 ; 1 : 400, 1 : 1600.

La sensibilité de la réaction augmente avec la concentration en immuno-globulines aussi bien dans la couverture que dans le conjugué. Cependant la dilution des Ig 6 dans le conjugué, plus que dans la couverture, affecte la sensibilité de la réaction (la DO passe de 1.9 à 1.05 pour une dilution de 10 des Ig 6 dans la couverture et de 1.9 à 0.65 pour une dilution de 4 dans le conjugué). Un compromis raisonnable entre sensibilité et économie peut être obtenu en utilisant la couverture à la concentration d'Ig 6 de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et le conjugué dilué 400 fois.

La figure (3) illustre l'augmentation de la sensibilité de la réaction avec le temps d'incubation. Une lecture de la réaction après une incubation du substrat de 2 h, a été par la suite couramment utilisée dans nos expériences.

Réduction du bruit de fond

La réaction ELISA utilisant dans la couverture et le conjugué non saturé du jus de plante saine donne parfois des bruits de fond importants. Cette réaction aspécifique est due à la

réaction des protéines de plantes contenues dans le jus de plante saine avec les anticorps anti-protéines de plantes contenues dans le serum. La figure (4) illustre les résultats obtenus avec différentes dilutions du jus de plante saine dans la couverture et dans le conjugué.

L'incubation de la couverture dans le jus de plante saine dilué 10 fois diminue notablement la sensibilité de la réaction, alors, qu'au contraire l'incubation du conjugué dans du jus de plante saine dilué 100 fois une demi-heure avant utilisation d'une part augmente la sensibilité de la réaction et diminue d'autre part la réaction aspécifique (DO est de 0.22 pour le conjugué non-saturé et de 0.12 pour le conjugué saturé. Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres couples virus - plante-hôte (LISTER, 1978).

Utilisée avec succès pour plusieurs expériences, l'incubation du conjugué dans du jus de plante saine, a parfois conduit à des résultats abérants. Aussi par la suite nous avons été conduits à diluer les Ig 6 couplées dans le tampon "conjugué" uniquement.

Détection du virus dans les jus de plante

La figure (5) illustre les résultats obtenus avec des dilutions successives de jus de plantes virosées et saines de *Nicotiana benthamiana* et de manioc. Les extraits de plantes sont obtenus par broyage au mortier des feuilles terminales présentant des symptômes accentués (mosaïque, gaufrage, nanisme). Le test ELISA permet une détection du virus jusqu'à la 10e dilution (1 : 2048 P/V (gr/ml) dans le cas d'extraits de tabacs et la 7e dilution (1 : 256 gr/ml) pour les extraits de manioc. Pour les tabacs l'intensité de la réaction croit régulièrement avec la concentration en jus de plante. Dans le cas du manioc, au contraire, le maximum est atteint pour des dilutions du jus des plantes entre 1/12 et 1/16 (gr/ml). La présence d'inhibiteur dans les plants de manioc pourrait expliquer pourquoi l'intensité de la réaction diminue pour les fortes concentrations de jus de plante. Aussi un de nos premiers objectifs a-t-il été de mettre au point une méthode efficace pour l'extraction du virus à partir de plants de manioc.

Extraction du virus à partir de manioc virosés

Les figures (6) et (7) illustrent les résultats obtenus en ELISA après extraction du virus par différents traitements des manioc virosés.

- Expérience 1 : - traitement 1 : manioc broyé (1 gr/4 ml de tampon, filtré sur étamine.
 2 : manioc broyé (1 gr/4 ml) filtré, soumis à une centrifugation basse vitesse (10 min à 5000 g)
 3 : manioc broyé, filtré (1 gr/4 ml). Ajoutez de 2 ml/gr de chloroforme, agitation 1/2 h , puis soumis à une centrifugation basse vitesse (10 min, 5000 g).

- Expérience 2 : - six méthodes d'extractions sont comparées
- 1 broyage (1 gr/15 ml) dans tampon extraction (TpE), filtré sur étamine
 - 2 broyage avec 1 mg/ml de bentonite dans TpE
 - 3 broyage, avec 1 mg/ml d'acide nicotinique
 - 4 broyage 1, puis clarification au chloroforme,
 - 5 broyage 1, puis clarification au butanol chloroforme (10-90%)
 - 6 broyage 1, puis clarification au triton 1%.

L'extraction au chloroforme (traitement 3, exp. 1 ; traitement 4, exp. 2) permet d'obtenir les valeurs en ELISA les plus élevées, en particulier dans le cas des premières dilutions de jus de plante. Il semblerait en effet que les phénomènes d'inhibition en ELISA, constatés pour les faibles dilutions, soient annulés par le traitement au chloroforme (2 ml/gr) et dans une moindre mesure au butanol chloroforme (10-90%) (traitement 4, exp. 2). 6

Détection du virus en ELISA par immersion de pastilles ou de disques de feuilles

Pour certaines combinaisons virus-plante-hôte, une simple immersion dans les puits de disques de feuilles prélevés à "l'emporte pièce" sans broyage préalable a permis un diagnostic fiable du virus par le test ELISA. C'est le cas pour le virus de la mosaïque du concombre et du virus Y de la pomme de terre à partir de poivrons (MARCO and COHEN, 1977). D'autre part nous avons prélevé à l'emporte pièce des "pastilles" des papiers filtres préalablement trempés dans un extrait de plante virosée.

Nous avons immergé, dans chaque puits, de 1 à 5 disques des pastilles obtenues à partir de feuilles de tabacs ou de manioc. Cette technique n'a pas réussi, les faibles concentrations en virus ou la présence d'inhibiteurs, sont probablement responsables. Les essais dans cette voie se poursuivent.

Utilisation d'un homogénéiseur

L'utilisation d'un homogénéiseur ultra-turax permet une extraction rapide (15 sec) dans des conditions standardisées reproductibles en présence des faibles volumes de tampon (5 ml).

Détection du virus et intensité des symptômes

Des feuilles de manioc virosées, dont l'intensité des symptômes varie de 0 à 5 suivant l'échelle de (COURS, 1951) sont testées par la méthode ELISA. Dans l'expérience 1 : les feuilles sont broyées au mortier dans le tampon extraction (PBS-Tween - PVP), passées sur étamine et testées en ELISA. Dans l'expérience 2 les feuilles sont clarifiées par traitement au chloroforme. Le tableau () illustre les résultats obtenus.

INTENSITES DES SYMPTOMES	0	1	2	3	4	5
Exp. 1 : N° de plantes détectées par ELISA / nbre de plantes testées	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Exp. 2 N° de plantes détectées par ELISA / nbre de plantes testées	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3

Seules les feuilles présentant les symptômes les plus accentués (4-5) ont donné des résultats positifs. Les feuilles virosées avec des symptômes de 0 à 4 n'ont pas réagi de façon significativement supérieure au témoin sain. Ces résultats indiquent les possibilités et fixent les limites du test, qui n'est pas, à l'heure actuelle, plus sensible que l'observation directe des symptômes en champs.

DISCUSSION

Les résultats obtenus jusqu'à présent permettent d'établir la validité et les limites du test. Le test ELISA permet une détection rapide du virus dans les jus de tabacs et de manioc. La sensibilité, supérieure à la double diffusion sur agarose, est comparable voire supérieure à celle obtenue par transmission mécanique. Cependant, le virus n'a pu être détecté dans des feuilles de manioc présentant des symptômes accentués (de 0 à 4, suivant l'échelle de COURS). Ce résultat illustre les difficultés rencontrées actuellement, et diffère pour l'instant l'application à l'épidémiologie de ce test. Le principal facteur limitant semble être le faible titre des serums obtenus de l'ordre de 1 : 100, alors que des titres plus élevés (1 : 500) sont généralement recommandés. (BAR JOSEPH et GARANSEY, 1981). Aussi nos efforts vont-ils s'orienter vers l'augmentation du titre du serum, et la réduction des réactions aspécifiques par injection répétée de solution de virus purifié, passé sur gradient, ainsi que la fixation du virus sur différents supports (cristaux hydroxyapatite par exemple) afin d'augmenter le pouvoir immunogène de l'inoculum.

Cependant le test, sous ses formes actuelles, offre de nombreuses possibilités, justifiant déjà sa mise en oeuvre. Il permettra de suivre les différents étapes de la purification afin d'en augmenter le rendement. Il permettra d'autre part d'évaluer précisément le titre du serum afin d'optimiser le "calendrier" des injections et des prélèvements.

BIBLIOGRAPHIE

- ALAGIANAGALINGAM, M.N. and RAMAKRISHNAN, R. 1966.-
Cassava mosaic in India. S. Indian Hort. 14/1-4), 71-72.
- ANONYME -
Memento de l'Agronome 1981. Ouvrage collectif.
Techniques rurales en Afrique, p. 487-498.
- BAR-JOSEPH, M., and GARNSEY, S.M. 1981.-
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : principles and applications for diagnosis of plant viruses p. 35-49.
In Plant diseases and vectors Harris et Maramorosh publishers. Academic press.
- BOCK, K.R., GUTHIE, E.J. 1977.-
African mosaic disease in Kenya. Proceedings cassava protection workshop. CIAT. Cali, Columbia, p. 41-44.
- BOCK, K.R. and E.J. GUTHRIE, 1978.-
Transmission of African cassava mosaic by mechanical inoculation. Plant Drs. Rep. 62 : 580-581.
- BOCK, K.R., E.J. GUTHRIE and G. MEREDITH, 1978.-
Distribution, host range and purification of cassava latent virus, a geminivirus. Ann. Appl. Biol., 90 : 361-367.
- CLARK, M.F. and ADAMSC A.N. 1977.-
Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorben assay for the detection of plant viruses.
J. Gen. Virol. 34 : 475-483.
- COSTA, A.S. 1976.-
Whitefly transmitted plant diseases.
Ann. Rev. Phytopathol. 14 : 429-449.
- COURS, G. 1951.-
Memoires de l'Institut Scientifique de Madagascar.
Série B Tome III. Fasc. 2.
- DIZES, J. 1975.-
Aperçus sur le manioc et sa culture.
Rapport ORSTOM, multigr.
- DUBERN, J. 1979.-
Some properties of african cassava mosaic disease transmission.
Phytopathol. Zeitscheif 96 : 25-39.
- FAUQUET, C. et J.C. THOUVENEL, 1981.-
Mosaïque du manioc.
Toumodi. Rapport ORSTOM. 6p.

- FAUQUET, C. et J.C. THOUVENEL, 1980.-
Réflexions sur l'éradication de la mosaïque africaine
du manioc.
Rapport ORSTOM, 5p.
- LISTER, R.M., 1978.-
Application of enzyme linked immunosorbent assay for
detecting viruses in soybean seed and plants.
Phytopathology 68: 1393-1400.
- GOODMAN, R.M. 1981.-
Review articles. Geminiviruses : J. Gen. Virol. 54, 9-21.
- MARCO, S. and COHEN, S. 1977.-
Rapid detection of viruses and evaluation of their titer
in pepper by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA.
Phytopathology, 69 : 1259-1262.
- OUTCHERLONY, O. 1968.-
Handbook of immunodiffusion and immuno-electrophoresis.
From Prog. Allergy. Ann. Aber. Sci. Publish, Michigan.
135pp. (with appendices 215 pp.)
- POLSON, A., M. BARBEUA Von NECHMAR, M.H.V. Van REGENMORTEL, 1980.-
Isolations of viral Ig γ antibodies from yolk of
immunized hens.
Immunological communications, 915, 475-493.
- STONEY, H.H. and NICHOLS, R.F.W. 1938.-
Studies of the mosaic of cassava.
Ann. Appl. Biol. 91, 51-59.
- VEKEN, Van der, J.A., SLOGTEREN, D., NORTH and J.P.H. Van der WANT
1962.- Immunological methods *in* linskins and M.V. Tracey
(eds). Modern methods of plant analysis 5 : 422-463.
Springer - Berlin.
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E. and BARTLETT, A. 1977.-
The enzyme. linked immunosorbent assay ELISA.
Flowline Puls., Guernsey, Europe, 48pp.
- WALTER, B. 1981.-
Isolation and purification of a virus transmitted from
mosaic diseased cassava in the Ivory Coast.
Plant Disease 64 : 1040-1042.

	128 A	128 B	128 C	128 D	128 E	128 G	128 H	131 A
	32	32	96	96	64	32	32	X
A	0.207	0.295	0.496	0.490	0.398	0.286	0.248	0.262
B	131 B	131 C	131 D	131 E	131 F	131 G		
A	64	64	64	32	64	32		
B	0.386	0.346	0.311	0.269	0.304	0.328		

Tableau 1 -

- A. Titres obtenus en tests de double diffusion en agarose.
- B. Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA pour une dilution de 400 du sérum dans le tampon couverture.

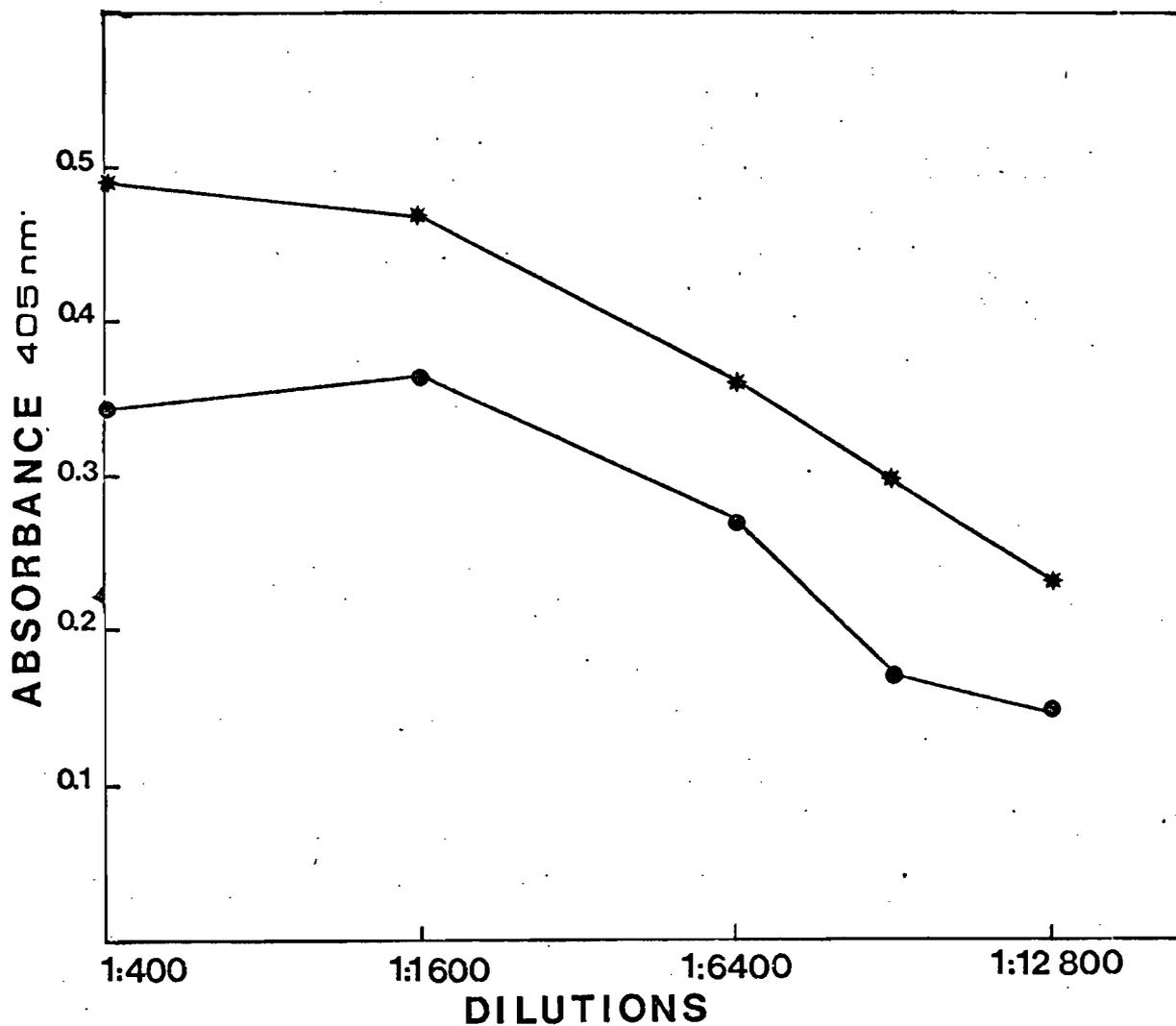


Fig. 1 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec des dilutions successives du serum 128 C (x) et 131 C (o) dans le tampon "couverture" en utilisant comme antigène du jus de *Nicotiana benthamiana* virosé (1 : 4 gr/ml) et le conjugué dilué 400 fois dans le tampon "conjugué".

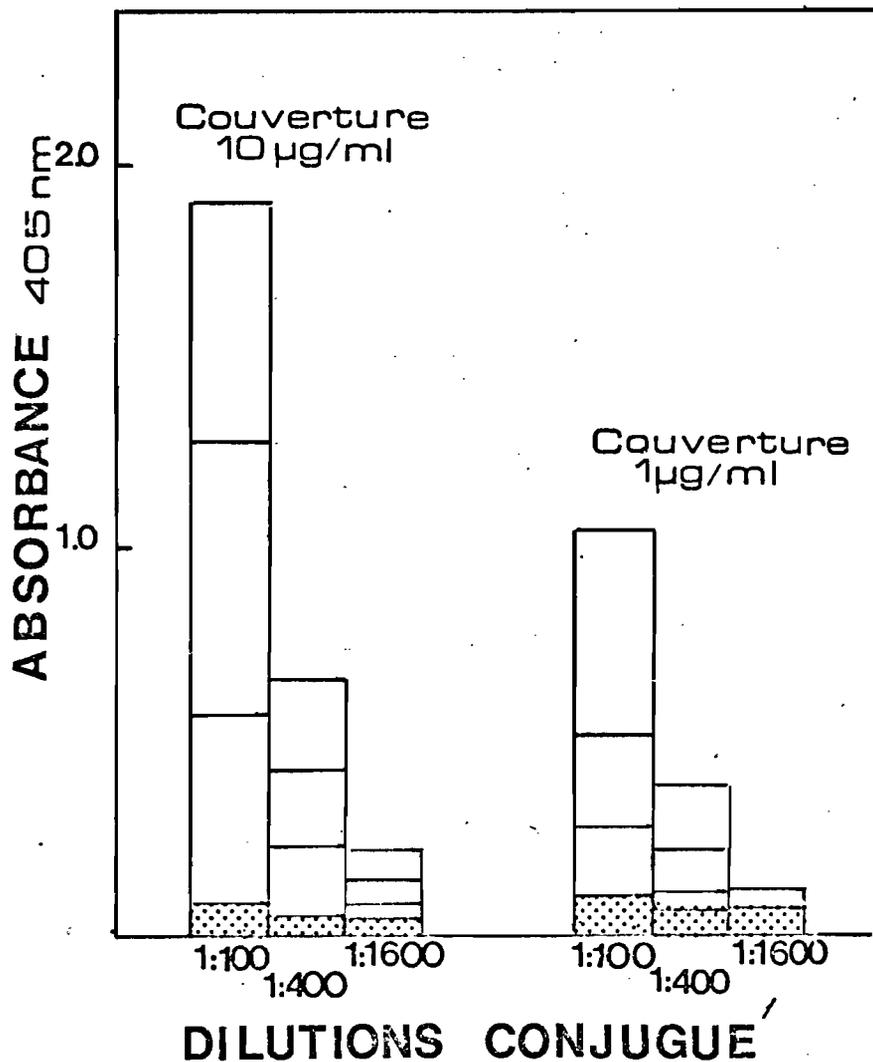


Fig. 2 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec des concentrations en immunoglobulines du serum 128 C dans le tampon "couverture" de 10 µg/ml) 1 µg/ml et 0,1 µg/ml et des dilutions du conjugué de 1 : 100 ; 1 : 400 et 1 : 1600 dans le tampon conjugué. Un extrait de *N. benthamiana* virosé (1 : 4 gr/ml) a été utilisé comme antigène. Les résultats obtenus avec les Ig 6s à la concentration de 0.1 µg/ml dans le tampon "couverture" n'ont pas donné de résultats significativement supérieurs au témoin sain et n'ont pas été représentés.

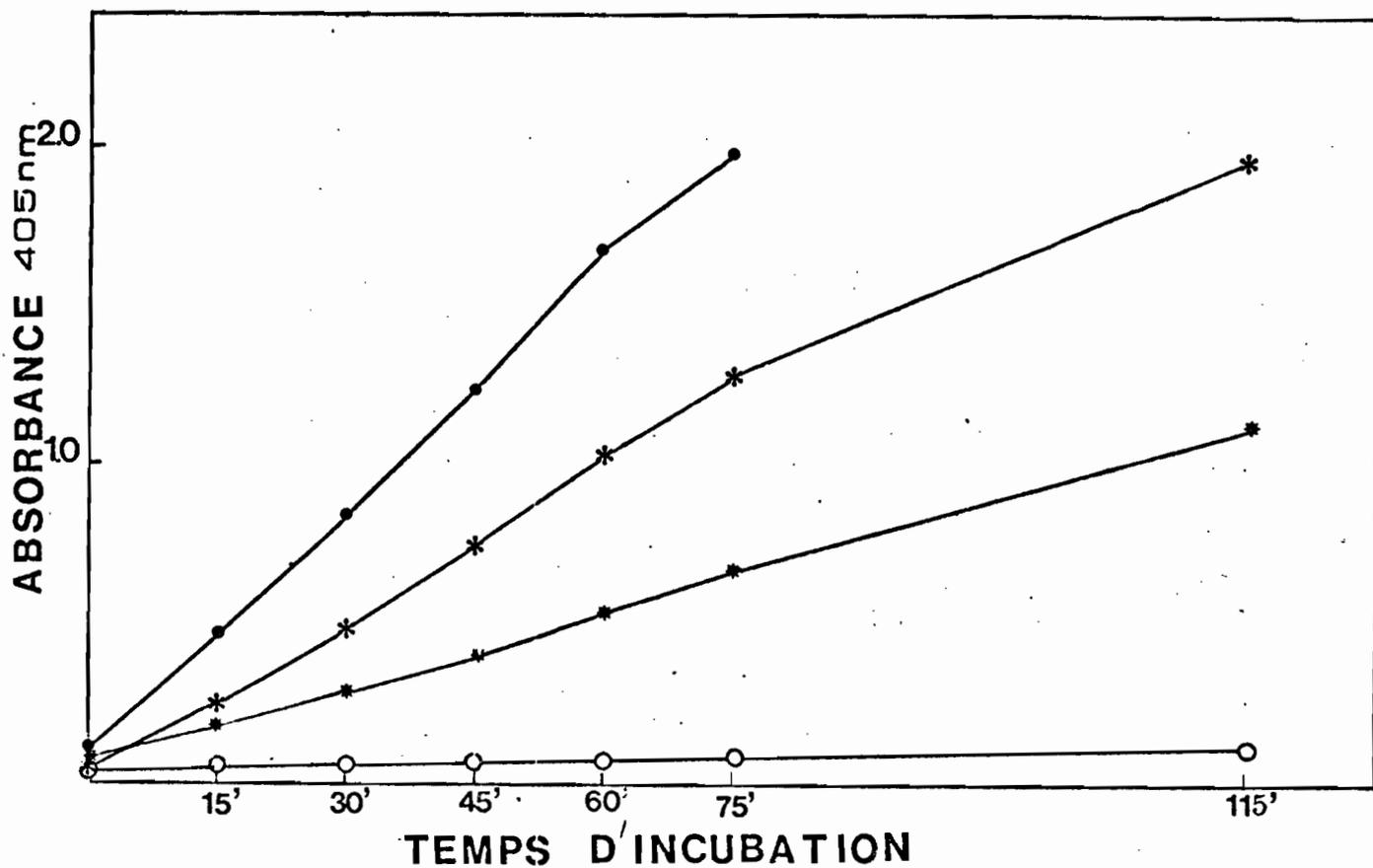


Fig. 3 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA après différents temps d'incubation du substrat. Les IgGs sont à 10 ug/ml dans le tampon "couverture".

(*) : le conjugué est dilué 400 fois dans le tampon conjugué, et du jus de feuilles de *N. benthamiana* virosé (1:4 gr/ml) est utilisé comme antigène.

(*) : conjugué est dilué 100 fois, antigène 1:200 (gr/ml).

(●) : conjugué dilué 100 fois, antigène 1:4 (gr/ml)

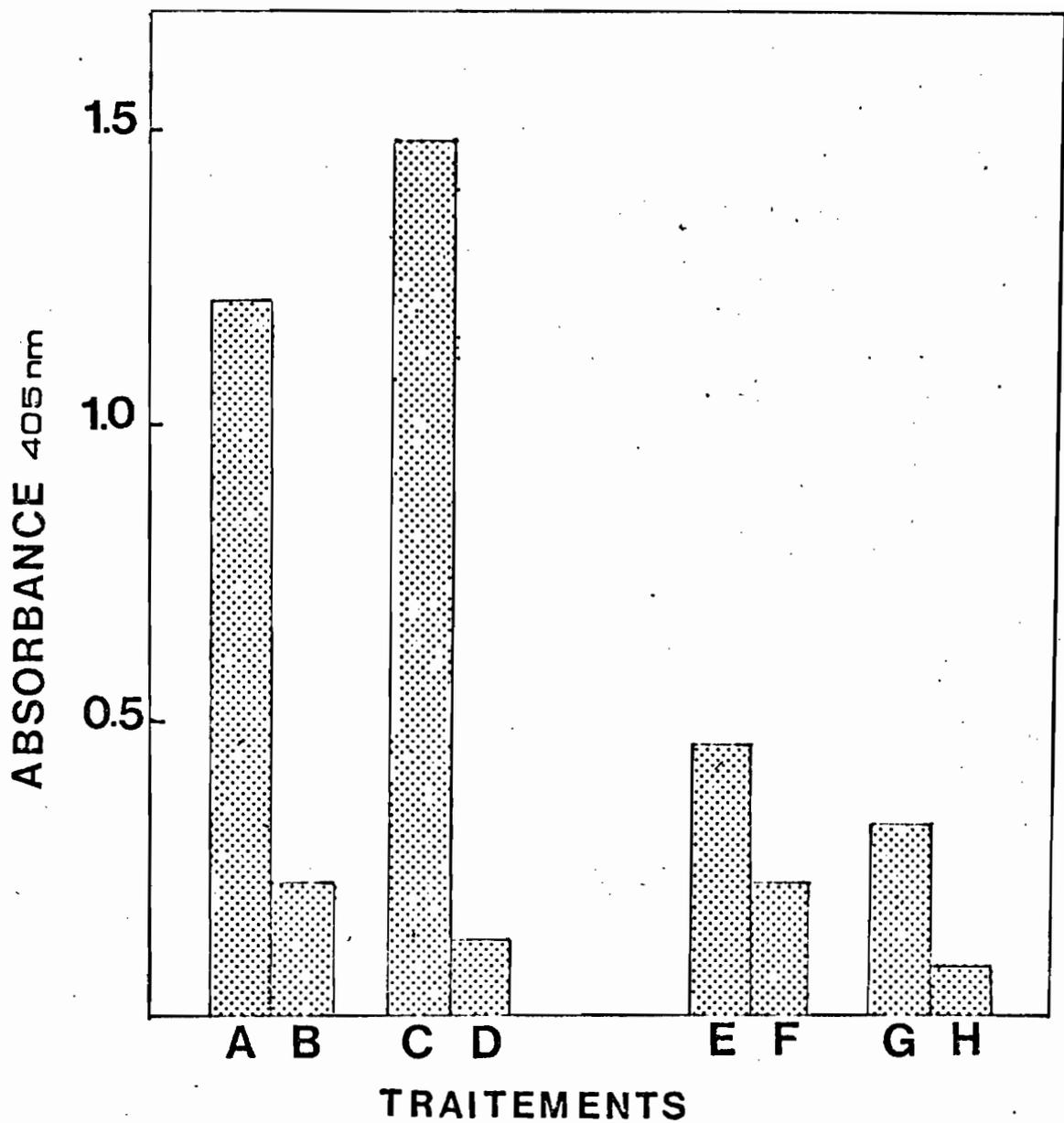


Fig. 4 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec différentes dilutions du jus de plante saine (*Nicotiana benthamiana*) dans la "couverture" et le "conjugué".

- A : "Couverture". Ig 6 à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans tampon
"Conjugué" couverture 1:400 dans tampon conjugué
Antigène : jus de *Nicotiana benthamiana* virosé.
- B : "Couverture ; conjugué : idem A
Antigène : jus de *N. benthamiana* sain
- C : "Couverture" Ig 6 à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans tampon couverture
"Conjugué" : 1:400 dans du jus de *N. benthamiana* sain
(1 gr : 100 ml de tampon conjugué).
- D : Couverture, conjugué, idem C
Antigène : jus de *N. benthamiana* sain
- E : Antigène, conjugué, idem A
Couverture : Ig 6 à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans jus de *N. benthamiana*
sain (1 gr : 100 ml de tampon couverture).
- F : idem E : couverture, conjugué.
Antigène : jus de *N. benthamiana* sain
- G : Antigène, conjugué, idem C.
Couverture : Ig 6 à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans jus de *N. benthamiana*
sain (1 gr : 100 ml de tampon couverture).
- H : Couverture, conjugué, idem G.
Antigène : jus de *N. benthamiana* sain.

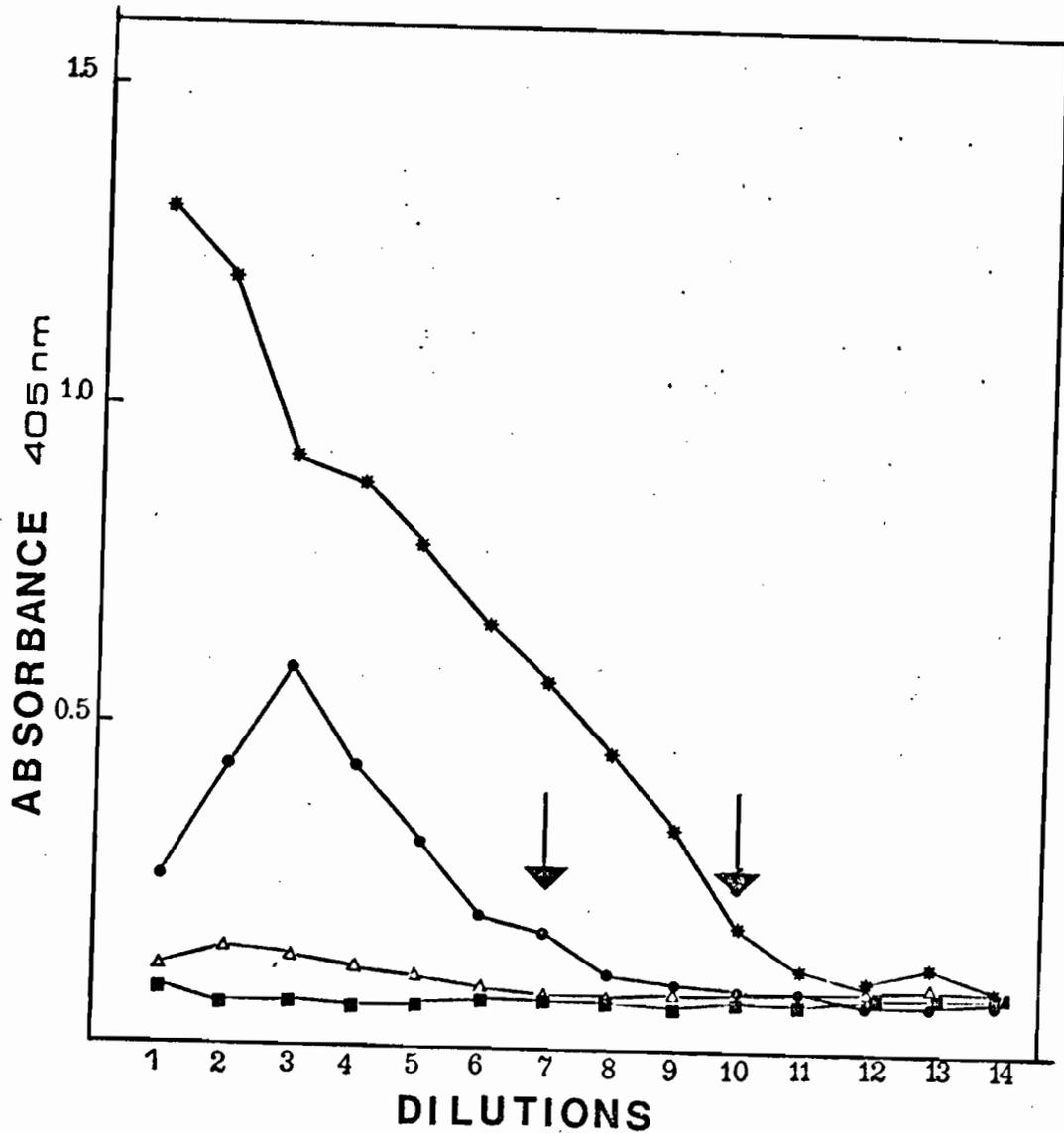


Fig. 5 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec des dilutions successives de 2 en 2 dans le tampon antigène de jus de feuilles des *N. benthamiana* virosées (x), saines (o), et de jus de feuilles de manioc virosées (o) et saines (Δ). Les flèches indiquent la dilution limite donnant une absorbance significativement supérieure au bruit de fond. Les Ig 6s sont à 10 µg/ml dans le tampon "couverture" et le conjugué dilué 400 fois dans le tampon "conjugué".

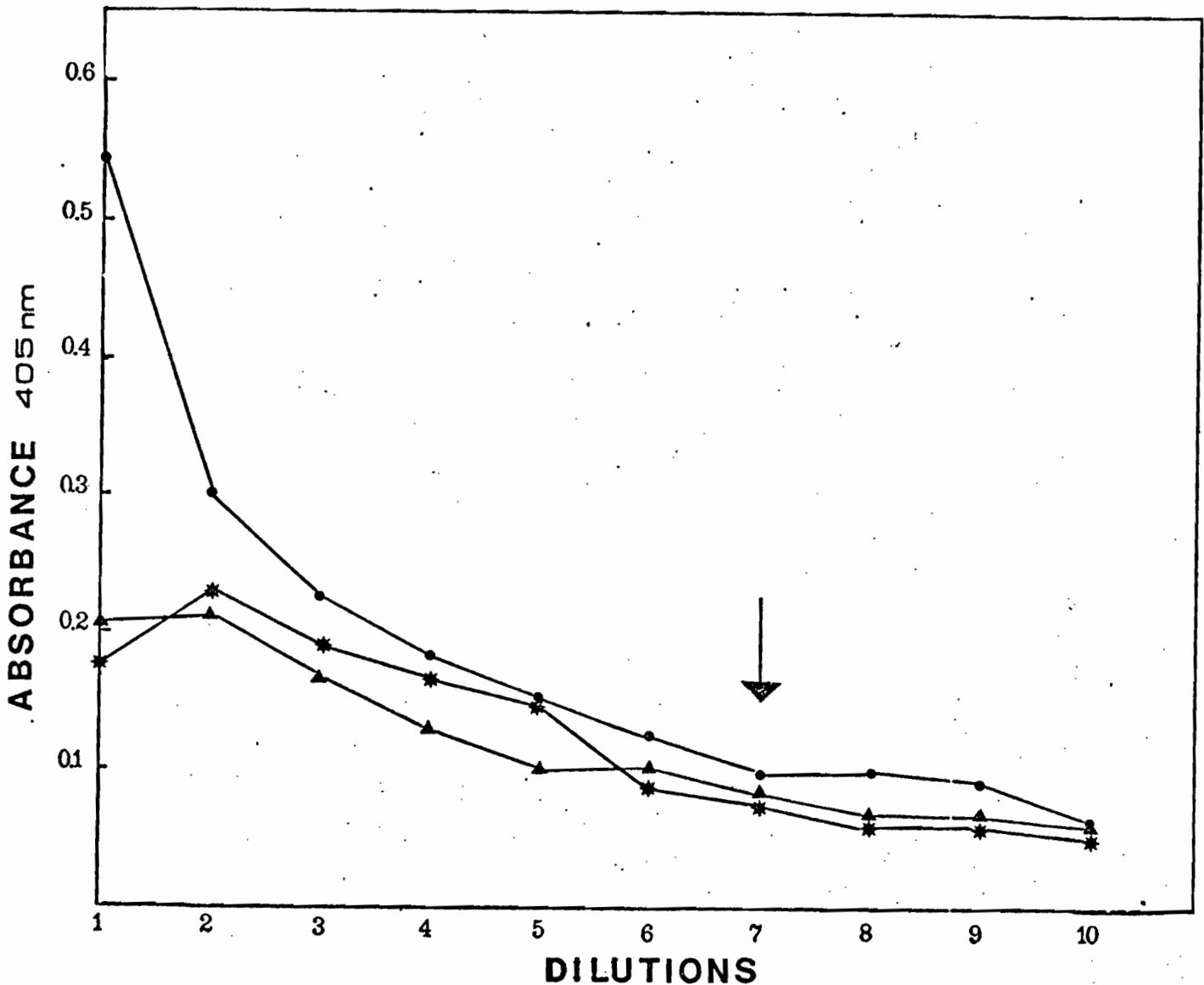


Fig. 6 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec des dilutions de jus de manioc virosés extraits par différents procédés. La flèche indique la dilution limite donnant une absorbance significativement supérieure au bruit de fond.

Traitement 1 : (x) manioc broyé (1 gr/4 ml de tampon), filtré sur étamine.

2 : (Δ) manioc broyé (1 gr/4 ml), filtré, soumis à une centrifugation basse vitesse (10 min à 5000 g).

3 : (o) manioc broyé, filtré (1 gr/4 ml) Ajouter 2ml/gr de chloroforme, agitation 1/2 h, puis soumis à une centrifugation basse vitesse (10 min, 5000 g).

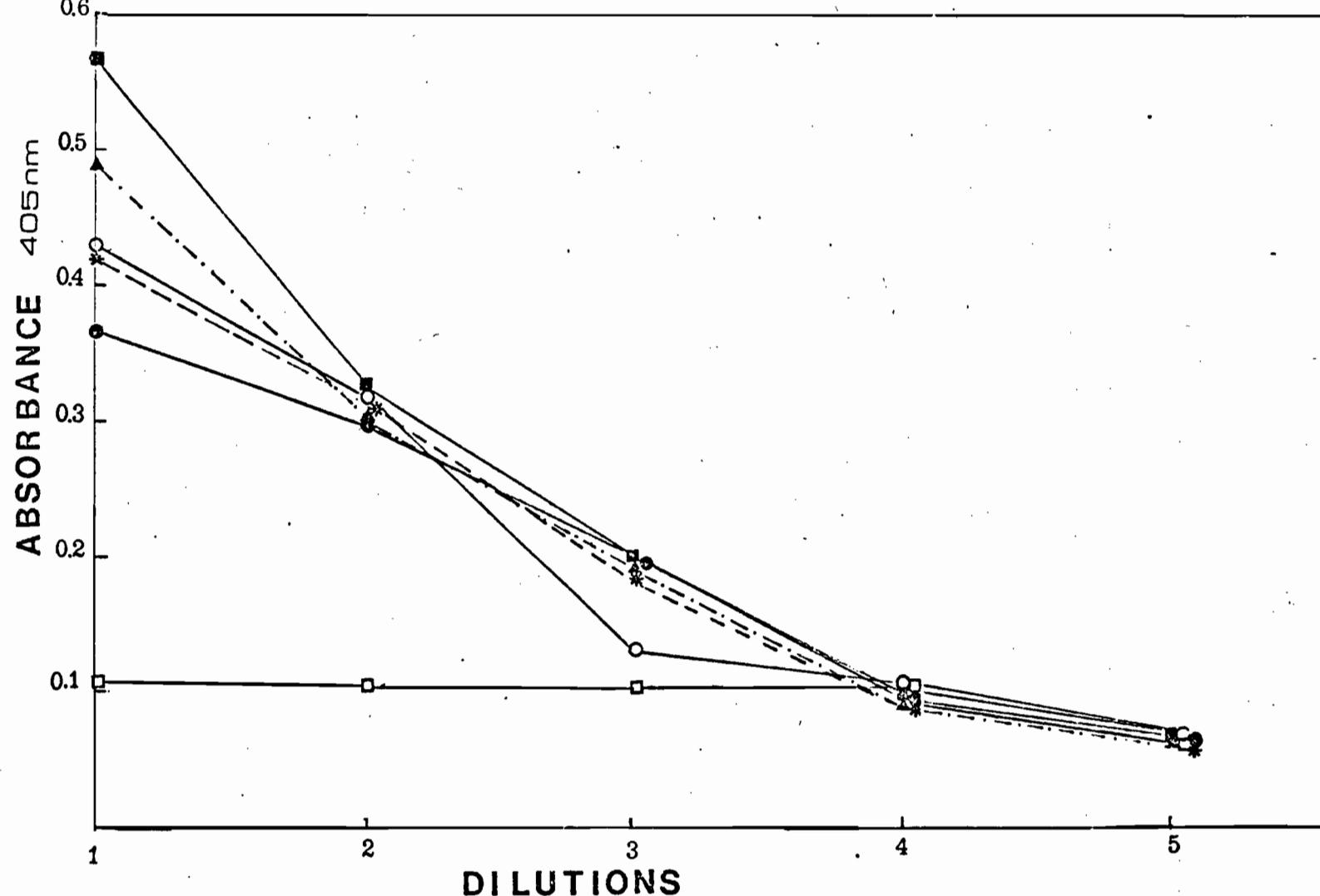


Fig. 7 : Absorbances (A 405 nm) obtenues par ELISA avec des dilutions de jus de manioc virosés extraits par différents procédés.

Traitement 1 : broyage (1 gr/15 ml) dans tampon extraction (TpE), filtré sur étamine.*

○2 : broyage avec 1 mg/ml de bentonite dans TpE.

□3 : broyage, avec 1 mg/ml d'acide nicotinique

■4 : broyage 1, puis clarification au chloroforme.

▲5 : broyage 1, puis clarification au butanol-chloroforme (10-90%).

●6 : broyage 1 puis clarification au triton 1%.

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIPODOUME

B.P. V-51 - ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Virologie

ESSAIS DE TRANSMISSION D'UN RHABDOVIRUS DU BLÉ PAR LE
DELPHACIDE *LAODELPHAX STRIATELLUS* Fall.

par

Denis FARGETTE

Août 1982

INTRODUCTION

Les delphacides ont été beaucoup moins étudiés que les aphides et les cicadelles en tant que vecteur d'agents phytopathogènes. Cependant 10 espèces vectrices transmettant 12 agents phytopathogènes, 10 virus et 2 mycoplasmes, ont été signalés (KISIMOTO, 1973). La transmission est de type circulatif-propagatif, et présente une spécificité très étroite (SINHA, 1973 ; HARRIS, 1979). Au cours du stage effectué en novembre 1981 à l'ENSAM, Laboratoire d'Ecologie Animale, nous nous sommes intéressés à la transmission de la maladie des stries chlorotiques du blé (Wheat chlorotic streak mosaic virus ; WCSMV) par le delphacide *Laodelphax striatellus*

La maladie : une maladie à virus du blé sur (*Triticum durum* DESF) caractérisée par le développement de stries chlorotiques sur les feuilles a été signalée dans la région de Montpellier au printemps 1971 (SIGNORET et al., 1972). En 1974, les dégâts ont été importants et la maladie a pu être observée dans d'autres régions du midi de la France (SIGNORET et al., 1977). Cette affection est caractérisée par l'apparition en fin de montaison de stries chlorotiques surtout développées sur la feuille drapeau. Les plantes atteintes sont en général naines, donnent des épis de taille réduite ne dégainant pas ou peu et renfermant des grains petits et mal formés. Les barbes courtes ou en partie absentes sont mosaïquées. Il a été montré qu'*Agropyrum repens*, mauvaise herbe vivace pouvait héberger ce virus et jouer ainsi le rôle de plante réservoir (SIGNORET et al., 1976). Cette maladie a été nommée "Maladie des stries chlorotiques du blé" (Wheat chlorotic streak mosaic virus : WCSMV).

L'agent pathogène : l'agent pathogène a été mis en évidence en microscopie électronique, par la méthode de l'exudat foliaire (leaf-dip) et par étude ultrastructurale (SIGNORET et al., 1972). Il s'agit de particules bacilliformes de virus ayant environ 345-365 nm de long et 62 nm de diamètre. Sur ces particules aux extrémités arrondies on note une région périphérique claire et régulière (10-15 nm d'épaisseur) entourant une région centrale 137 nm d'épaisseur)

plus dense aux électrons finement striée dans le sens transversal (SIGNORET et *al.*, 1976).

La transmission : le virus peut être transmis par le delphacide *Laodelphax striatellus* Fallen (LECLANT et SIGNORET, 1976). Les durées minimum des périodes d'incubation et d'inoculation sont respectivement de 9 à 12 j et de 10 minutes (SIGNORET et *al.*, 1977). Des échecs de transmission par aphides, *Rhopalosiphum padi* L., *Schizaphis graminum* Rond., *Macrosiphum* (Sitolian) *avenae* F., ont été enregistrés. L'hypothèse d'une transmission par la semence a été émise (LECLAUT et SIGNORET, 1976).

La symptomatologie, la morphologie des particules virales et les caractéristiques de la transmission rapprochent le WCSMV du barley yellow striate mosaic virus isolé par CONTI (1969, 1972, 1973).

Position du problème : des échecs soudains et répétés ont été constatés dans les essais de transmission réalisés à Montpellier à la fin 1976 (SIGNORET et *al.*, 1977). Les delphacides *Lostriatellus* issus de l'élevage de masse utilisé jusqu'alors étaient devenus inaptes à transmettre l'agent pathogène. L'étude de la virose avait alors été interrompue. Une recrudescence soudaine du WCSMV l'été dernier à Montpellier a suscité un regain d'intérêt pour l'étude de cette maladie. Récemment un programme de recherches a été établi dans le cadre du Doctorat es-sciences de Mr. KHODEIR (Egypte). Il étudie les modifications ayant affecté le vecteur et l'agent pathogène et ayant provoqué les échecs de transmission. Nous avons été amené au cours de ce séjour à participer à quelques expérimentations. Les techniques utilisées sont décrites, les résultats présentés et quelques hypothèses émises.

MATÉRIEL ET MÉTHODES - RÉSULTATS

Assainissement de l'élevage : une population de delphacides *Lostriatellus* a été récoltée au filet fauchoir dans la région d'Avignon. La première étape consiste à assainir l'élevage, c'est à dire débarrasser la population des agents phytopathogènes qu'elle est susceptible de transmettre. Aussi on transfère des femelles fécondées (reconnaissable à leur abdomen gonflé) sur blés sains. Les femelles insèrent leurs oeufs dans leur parenchyme foliaire. Après une dizaine de jours on prélève des fragments de feuilles desséchées que l'on dépose au pied de jeunes plantules de blé. Les larves nouvellement écloses passent spontanément sur les jeunes pousses et permettent de "démarrer" un élevage sain. Néanmoins, par cette technique, on ne peut, évidemment, éliminer les agents pathogènes se perpétuant par passage trans-ovarien.

Essais de transmissions :

Deux lots d'une trentaine de delphacides sont transférés sur un pied d'*Agropyrum repens* extériorisant des symptômes de stries caractéristiques du WCSMV. Après 48 h. d'acquisition, chaque lot est transféré sur un pot de plantules de blés stade 2-3 feuilles. On dispose de deux pots témoins, l'un comprenant un lot de delphacides sains, l'autre sans insectes les plantes tests sont renouvelées tous les dix jours. 4 semaines après l'inoculation aucun symptôme caractéristique du WCSMV n'a été observé en utilisant du delphacide issu du "nouvel" élevage mis en route 4 mois auparavant. Des résultats similaires ont été obtenus par Mr. KHODEIR, plus de six semaines après l'inoculation, en utilisant comme source des pieds d'*agropyrum* aussi bien que de *phalaris*.

Microscopie électronique : pour s'assurer de la présence de particules virales dans le massif d'*A. repens* présumé réservoir, on utilise la technique de "l'exudat foliaire" (leaf-dip). On dilacère des fragments de feuilles d'*A. repens* présentant des symptômes caractéristiques dans une goutte d'acétate d'uranyle. On dépose la goutte une à deux minutes sur une micro-grille de carbone. La grille est conservée dans une "gellule", puis observée au microscope électronique.

Des particules virales bacilliformes ont effectivement été observées dans un des deux échantillons d'*Agropyrum*. Il a été aussi observé dans un *phalaris* présentant des symptômes de stries, des particules de rhabdovirus.

DISCUSSION

La transmission de type circulatif-propagatif est un processus biologique complexe, impliquant un grand nombre d'étapes dont les mécanismes sont encore peu connus. Parmi ces étapes, signalons l'activité comportementale du vecteur, l'aptitude du virus à se multiplier dans l'hôte, la présence ou l'absence d'inhibiteurs dans les tissus ou les sécrétions de l'hôte, la perméabilité des différents tissus au travers desquels le virus doit circuler, notamment ceux de la paroi intestinale (SINHA, 1973) et des glandes salivaires (ROCHOW, 1969).

La transmission de type circulatif-propagatif présente une spécificité très étroite, la modification d'une seule caractéristique de l'agent pathogène ou du vecteur pouvant provoquer des échecs de vection. Etudier l'échec de transmission du WCSMV par *L. striatellus* revient à rechercher quelles sont ces modifications et quelles en sont les causes. Ne disposant actuellement que de peu de résultats expérimentaux nous nous contenterons d'émettre quelques hypothèses basées sur une recherche bibliographique et nos résultats préliminaires. Nous indiquons aussi quelles directions nous sembleraient intéressantes à suivre dans le cadre d'un travail approfondi.

Modification des caractéristiques de transmission d'une population maintenue en élevage

Une population d'insectes maintenus en élevage est soumise à un environnement différent radicalement des conditions naturelles (température, éclairage, photopériode, hygrométrie, plante hôte) ; changements qui se répercutent sur la biologie de l'insecte. Son cycle est modifié (nombre de générations par an, fécondité...), son activité compartementale altérée (appétence, gamme d'hôtes...). Sa capacité intrinsèque de transmission pourrait elle aussi être modifiée. *L. striatellus*, vecteur dans sa niche écologique perdrait son aptitude vectrice lorsque soumis aux conditions d'élevage. On comprend mal cependant, dans cette hypothèse, pourquoi l'incompatibilité virus-vecteur s'est produite après plusieurs années de réussite dans les transmissions.

Au sein d'une même espèce, il existe des races ou biotypes caractérisés par des différences de capacité intrinsèque de transmission. Dès 1943, BLACK met en évidence l'existence de biotypes transmetteurs (TT) et non-transmetteurs (NT) d'un rhabdovirus, le potato yellow dwarf virus. Le même phénomène a été plusieurs fois observé pour d'autres couples virus-vecteurs (WATSON et SINHA, 1959 ; NAGARAJ et BLACK, 1962 ; KISIMOTO, 1967, BEHNEKEN, 1973, TISIAN et ALM, 1973). Dans le cas du delphacide *L. striatellus* des biotypes TT et NT pour au moins trois virus ont été mis en évidence. Il s'agit du rice stripe virus, du maize rough dwarf virus et de l'oat sterile dwarf virus (KISIMOTO, 1967 ; LINDSTEIN et CONTI, 1977). On peut donc envisager que la population de delphacides récoltés initialement consistait en un mélange de races TT et NT. Les conditions d'élevage favorisant le biotype NT, le biotype TT serait éliminé progressivement et les delphacides issus de l'élevage ne seraient plus aptes à transmettre.

Il est difficile de trancher, à posteriori, parmi ces diverses hypothèses. En utilisant comme vecteurs des delphacides récemment collectés dans la nature, n'ayant donc pas été soumis à un élevage prolongé, nous enregistrons aussi des échecs de transmission. Si des résultats identiques sont obtenus à partir d'autres populations "sauvages" de delphacides *L. striatellus* il semble alors improbable que l'échec de transmission à partir d'*Agropyrum* soit imputable à une modification de l'aptitude vectrice des delphacides. En fait les changements de capacité de transmission d'insectes maintenus en élevage ont été peu étudiés. On connaît mieux le cas de virus ayant évolué au cours du temps et ayant abouti à la perte de "transmissibilité".

Modification de la "transmissibilité" d'un virus maintenu végétativement

OMAN (1969) déclare en ce qui concerne la transmission de virus par aphide "il semble raisonnable de supposer qu'un virus dispose d'une grande plasticité génétique pour s'adapter aux nombreux changements d'hôtes et de physiologie de l'hôte qui résultent de l'association avec son puceron vecteur". Rien n'interdit de penser que, pour les mêmes raisons, les virus transmis par cicadelles et delphacides disposent eux aussi d'une grande plasticité génétique. Aussi "le passage du virus dans des conditions autres que

celles se produisant habituellement dans la nature soumet le virus à une pression de sélection inhabituelle qui peut aboutir à un isolement rapide des souches" (BLACK, 1959), (REDDY et BLACK, 1974) (WATSON, 1956 ; WATSON et SINHA, 1959). le potato yellow dwarf, par exemple est un rhabdovirus transmis dans la nature par cicadelles. Perpétué par inoculations mécaniques, l'isolat n'est plus, après plusieurs "repiquages" transmis par cicadelles (BLACK, 1953 ; BLACK et *al.*, 1958). Le même phénomène a été observé pour d'autres couples virus vecteurs (BADAMI, 1958 ; JENSEN, 1959 ; SYLVESTER and RICHARDSON, 1971). Dans tous les cas, les auteurs apportent les preuves que l'échec de la transmission est due à une dérive du virus. Les isolats de virus comportent des mélanges des souches TT et NT (LIVETAL, 1973 ; REDDY et BLACK, 1974). La souche (REDDY et BLACK, 1977) serait véhiculée avec la souche TT par un processus d'hétérocapsidation. Transmise mécaniquement ou végétativement la souche NT supplante la souche TT, et le virus perd progressivement sa transmissibilité.

BLACK (1959) prédit que "l'on trouvera dans des plantes se maintenant végétativement du virus ayant perdu leur aptitude à être transmis par insectes". Dans notre étude un massif d'*A. repens*, mauvaise herbe vivace, sert de réservoir de WCSMV, ce, depuis près d'une dizaine d'années. Aussi on peut envisager que l'isolat de départ de WCSMV, a pu dériver, et cette dérive aboutit, comme dans les cas précédents, à la perte progressive de "transmissibilité".

Propositions

En fait, le problème tel qu'il se présente actuellement est difficilement abordable. Sans certitudes, ni sur les caractéristiques de la source de WCSMV, ni sur l'aptitude vectrice des populations utilisées, on est réduit à des hypothèses difficilement vérifiables à posteriori. Dans le cadre d'une étude approfondie, il faudrait, et c'est ce qui se réalise, reprendre le problème de la transmission du WCSMV par *L. striatellus* au départ, c'est à dire :

- isoler une souche de WCSMV et un biotype de *L. striatellus* transmetteur de cette souche,
- perpétuer l'isolat, à l'abri de toutes contaminations extérieures, par *L. striatellus*. Aussi on disposerait avec certitude, contrairement aux études menées jusqu'à présent, d'une souche et d'un biotype compatibles.

On pourrait étudier alors, en sélectionnant à chaque génération les individus qui transmettent et ceux qui ne transmettent pas, si il existe au sein d'une population de *L. striatellus* des biotypes TT et NT. Par la suite on pourrait poursuivre l'étude par l'analyse des différences morphologiques, physiologiques et éthologiques qui existent entre les deux races, et mettre en évidence celles qui peuvent rendre compte des différences d'aptitude vectrice. En prélevant périodiquement des lots d'insectes et en testant leur capacité de transmission, on vérifierait si effectivement *L. striatellus* maintenu en élevage perd son aptitude vectrice.

Les connaissances sur la transmission du WCSMV par *L. striatellus* sont encore épaisses et demandent à être complétées, en particulier par des études sur la multiplication du virus dans le vecteur, et sa transmission transovarienne. L'agent pathogène, bien que difficile à purifier, demande à être caractérisé par des critères physico-chimiques et sérologiques. Comment s'assurer, sinon, que les particules bacilliformes détectées dans des blés et des graminées sauvages sont effectivement des isolats du même virus ?

Parallèlement à l'étude du vecteur, on maintiendrait l'isolat de WCSMV, végétativement d'une part, et par delphacide de l'autre. En testant périodiquement la "transmissibilité" des deux isolats on vérifierait si il existe effectivement une dérive du virus.

On comprend que rechercher les causes d'échec de vections revient à s'intéresser aux mécanismes même qui déterminent la spécificité de la transmission et qu'il s'agit là d'un travail de "longue haleine". Ces études nécessitent la collaboration étroite d'un laboratoire de zoologie et de pathologie.

BIBLIOGRAPHIE

- BADAMI, R.S. 1958.- Changes in the transmissibility by aphids of a strain of cucumber mosaic virus.
Ann. appl. Biol. 46 : 554-620.
- BEHNCKEN, G.M. 1973.- Evidence of multiplication of sowthistle yellow vein virus in a inefficient aphids vector *Macrosiphum euphorbiae*.
Virology 53 : 405-412.
- BLACK, L.M. 1943.- Genetic variation in the clover leaf hopper's ability ot transmit potato yellow dwarf virus.
Genetics 28 : 200-209.
- BLACK, L.M. 1953.- Loss of vector transmissibility of viruses normally insect transmitted.
Phytopathology, 43 : 466 abstract.
- BLACK, L.M., WOLEYNS, S. and WHITROMB, R.F. 1958.- A vector less strain of wound tumor virus.
Int. Congr. Microbiol. 7th, Stochlom. Abstr. Commun. 255.
- CONTI, M. 1969.- Investigation on a bullet-shaped virus of cereals isolated in Italy from plant hoppers.
Phytopath. Z., 66 : 66-275.
- CONTI, M. 1972.- Barley yellow striate mosaic virus isolated from plants in the field.
Phytopath. Z., 73 (1) : 39-45.
- CONTI, M. et APPIANO, A. 1973.- Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasms in barley cells.
J. gen. Virol. 21 (2) : 315-322.
- CONTI, M. 1974.- *Laodelphax striatellus* as a vector of two cereal viruses in Italy.
Mikrobiologija, Vol. 11, N° 1 : 49-54.
- KISIMOTO, R. 1967.- Genetic variation in the ability of a planthopper vector ; *Laodelphax striatellus* (Fallin) to acquire the rice stripe virus.
Virology, 32 : 144-152.

- LECLANT, F. et SIGNORET, P.A. 1974. Premiers résultats concernant la transmission d'un rhabdovirus du blé par le delphacide *Laodelphax striatellus* Fall. C.R. 4e Journées de Phytologie. Phytopharmacie circum-méditerranéennes, Montpellier, p. 215-217.
- LECANT, F. et SIGNORET, P.A. 1976.- Premiers résultats concernant la transmission d'un rhabdovirus du blé par le delphacide. *Laodelphax striatellus* Fall. C.R. IVe Journées Phytiatr. Phytopharm. circum-méditerr. Montpellier.
- LINDSTEN, K. et CONTI, M. 1977.- Observations on the transmission of some phyto-reoviruses by different lines of vector plant hop pers. Annal. Phytopathologie, 9 : 307-311.
- LIU, H.V., KIMURA, I. et BLACK, L.M. 1973.- Specific infectivity of different wound tumor virus isolates. Virology 51 : 320-326.
- OMAN, P. 1969.- Criteria of specificity in virus vector relationships in "viruses, vectors and vegetation" p. 1-23. Edit. K. Maramorosch Interscience publishen.
- NAGARAJ, A.W. et BLACK, L.M. 1962.- Hereditary variation in the ability of a leaf hopper to transmit two unrelated plant viruses. Virology, 16 : 152-162.
- REDDY, D.V.R. and BLACK, L.M. 1974.- Deletions mutations of the genome segments of wound tumor virus. Virology, 458-473.
- REDDY, D.V.R. and BLACK, L.M. 1977.- Isolation and replication of mutant populations of wound tumor virions lacking certain genome segments. Virology 80, 336-346.
- ROCHOW, W.F. 1969.- Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. Phytopathology, 59 (11) : 1580-1589.
- SIGNORET, P.A., GIANOTTI, J., ALLIOT, R. 1972.- Particules de type viral chez *Triticum durum* Desf. présentant des symptômes de stries chlorotiques. Ann. phytopathol., 4 (1) : 45-53.

- SIGNORET, P.A., LECLANT, F., ALLIOT, B. 1976.- Virus des stries chlorotiques du blé (Wheat Chlorotic Streak Virus).
Identification, purification, transmission et épidémiologie.
Poljapr. Znan. Smotra, 39 (49) : 183-186.
- SIGNORET, P.A., CONTI, M., LECLANT, F., ALLIOT, B. et GIANOTTI J. 1977.- Données nouvelles sur la maladie des stries chlorotiques du blé (Wheat Chlorotic Streak Virus : WCSMV).
Ann. Phytopathol., 9 (3) : 381-385.
- SINHA, R.C. 1973.- Viruses and leaf hoppers p. 493.
In Viruses and Invertebrates.
- TIMIAN, R.G. and ALM, K. 1973.- Selective in breeding of macrostelloid fascifrons for increased efficiency in virus transmission. Phytopathology, 63 : 109-112.
- WATSON, M.A. 1956.- The effect of different host plants of potato virus C in determining its transmission by aphids.
Ann. appl. Biol. 44 (4) : 599-607.
- WATSON, M.A. and SINHA, R.C. 1959.- Studies on the transmission of european wheat striate mosaic virus by delphacides *pellucida* Fabricius.
Virology, 8 : 139-163.