

# Flavescence dorée - Recherches en cours sur les relations hôte-phytoplasme : comportement de ceps "résistants" et bases de la transmission spécifique par la cicadelle vectrice

Élisabeth BOUDON-PADIEU, Delphine DESQUÉ,  
Jean LARRUE, Denis CLAIR

UMR 1088 INRA - 5184 CNRS - Université de Bourgogne, Plante Microbe Environnement  
BP 86510, 21065 DIJON Cedex

## Résumé

La Flavescence dorée (FD) de la vigne est causée par un phytoplasme et transmise de façon très spécifique par une cicadelle ampélophage, *Scaphoideus titanus*. Il n'y a pas de résistance variétale connue chez la vigne. La lutte contre *S. titanus* est rendue obligatoire par application d'insecticides. Depuis l'apparition de la FD, les chercheurs ont observé des ceps ne montrant jamais de symptômes. Outre de tels ceps dits "résistants", il en est qui présentent un rétablissement après la crise de maladie et cette guérison s'accompagne d'une résistance temporaire (1 à 2 ans) et partielle, avec l'expression de symptômes "localisés", à des ré-inoculations.

Ce travail recherche dans la descendance végétative de ceps "résistants", la présence d'agents infectieux latents pouvant induire une protection ou une prémunition contre la FD, ainsi que la réponse de ce matériel à l'inoculation de FD. Une deuxième partie est l'étude des bases moléculaires de la transmission du phytoplasme par la cicadelle vectrice, par la comparaison entre isolats de phytoplasmes de la FD et de souches apparentées.

**Mots-clefs** : vigne, phytoplasme, flavescence dorée, comportement, vection, *S. titanus*, spécificité

## Summary

Flavescence dorée (FD) of the grapevine is associated with a phytoplasma and transmitted specifically by the vine-feeding leafhopper *Scaphoideus titanus*. No varietal resistance is known among grapevine cultivars. Control of the disease is compulsory, using insecticide treatments against *S. titanus*. Since the first outbreak of FD, researchers have observed that some vinestocks never showed symptoms. In addition to such "resistant" individuals, other stocks would recover after a first crisis and the latter recovery was also associated with a temporary (1-2 years) and partial resistance, with the expression of localised symptoms, to new inoculations.

The present project investigates the presence, in the vegetative offspring of "resistant" vinestocks, of latent infectious agents that could account for cross protection or premunition towards FD, as well as the response of the latter material to inoculation of FD. The molecular basis for specific transmission of the phytoplasma are investigated in a second part, by means of comparison between phytoplasma isolates of FD and related strains.

**Key-words** : grapevine, phytoplasma, flavescence dorée, behaviour, vection, *S. titanus*, specificity

## Introduction

La Flavescence dorée (FD), apparue dans les années 50 en France, est une maladie en extension continue depuis le déclenchement d'une nouvelle phase épidémique au début des années 80 (Boudon-Padieu, 2000a; 2002). La FD figure parmi les maladies de quarantaine en Europe. Sa lutte en France est régie par arrêtés ministériels (Arrêté du 9 juillet 2003). La lutte insecticide contre la cicadelle vectrice, l'espèce *Scaphoideus titanus*, est obligatoire à titre prophylactique dans les vignes de production en zone contaminée et à titre préventif sur tout le territoire national dans les vignes-mères et les pépinières. L'arrachage des ceps malades est obligatoire, ainsi que celui de la totalité des parcelles contaminées au-delà d'un seuil déterminé de maladie (20%).

Tous les cépages de *V. vinifera* sont sensibles, toutefois à des degrés divers. Certains ceps, francs de pied ou greffés, se rétablissent. Les vignes porte-greffe infectées n'ont pas de symptômes ou des indices faibles de maladie et sont porteurs permanents du phytoplasme. Le rôle du porte-greffe dans le comportement du plant greffé n'est pas connu.

Les foyers primaires ont pour origine principale l'introduction d'inoculum dans un vignoble sain, par du matériel de plantation infecté en incubation, sans symptômes visibles. Diverses observations de terrain et des expérimentations ciblées montrent que l'expression de symptômes peut prendre plusieurs années après la plantation. Cette introduction aura des conséquences dramatiques si la cicadelle vectrice s'est installée antérieurement dans le vignoble. La maladie n'est en général découverte qu'après extension notable des foyers primaires.

Outre la lutte insecticide sur les vignes-mères et les pépinières, le seul moyen de lutte préventive mis en œuvre, consiste en la surveillance du matériel de plantation et, depuis le dernier arrêté ministériel, au traitement curatif par trempage à l'eau chaude du matériel suspect. Quant à la lutte insecticide prophylactique, elle permet d'assainir progressivement les régions touchées mais elle n'empêche pas la diffusion sournoise de la maladie. Jusqu'en 1998, la FD était présente dans les régions viticoles du sud, du sud-ouest et du centre-ouest de la France. Après une alerte en Beaujolais en 1998, maintenant jugulée, elle s'est déclarée en 2000 en Savoie, puis en 2002 en Vaucluse et Drôme.

La lutte insecticide obligatoire pose un dilemme en agriculture biologique car les spécialités à base de roténone homologuées, n'ont pas une efficacité satisfaisante. En outre, les dispositifs de lutte intégrée envers d'autres ravageurs sont compromis de façon grave lorsque la lutte obligatoire est instituée, quel que soit l'insecticide, chimique ou biologique.

Depuis l'apparition de la FD, les chercheurs ont constaté que certains ceps se comportaient comme des individus "résistants" à la maladie (Caudwell, 1962). En outre, certains ceps présentent un rétablissement après la crise de maladie (Caudwell, 1961) et cette guérison s'accompagne d'une résistance temporaire (1 à 2 ans) à des ré-inoculations (Caudwell et Larrue, 1987) avec l'expression de symptômes "localisés". Quelques travaux d'épidémiologie ont montré la possible implication d'autres agents pathogènes dans la réponse individuelle des ceps "résistants". Il est en effet connu que la réponse d'une plante à une infection primaire peut contribuer à diminuer sa sensibilité à une seconde infection par un agent pathogène proche (prémunition) ou différent (protection croisée). Chez l'abricotier, des essais au verger ont montré la possibilité de prémunition des arbres par des souches atténuées de phytoplasmes de l'enroulement chlorotique (Castelain *et al.*, 1997). Une protection croisée par des népovirus a été postulée pour expliquer les comportements de résistance individuelle à la FD (Caudwell & Poitou, 1960, Schwartz, 1984). Toutefois les recherches en ce domaine étaient limitées à l'époque de ces travaux par l'absence de méthodes sensibles de détection et de caractérisation fine des phytoplasmes et d'autres agents pathogènes, en particulier viraux. Cette barrière est levée par le développement de méthodes de détection et de localisation *in situ* des phytoplasmes dans les plantes malades (Caudwell et Kuszala, 1992; Lherminier et Boudon-Padieu, 1996; Daire *et al.*, 1997; Lherminier *et al.*, 1999; Clair *et al.*, 2003) et de méthodes de diagnostic de nombreux virus de la vigne.

La première partie de la présente étude s'est intéressée aux observations antérieures de cas de résistance, dans une démarche prospective. Les résultats obtenus ne permettent encore aucune mise

en cause de pathogènes latents interagissant avec les phytoplasmes mais les travaux se poursuivent car l'expérimentation est extrêmement lourde. La deuxième partie de l'étude est une approche biochimique des systèmes de reconnaissance entre le phytoplasme de la FD et les organes des cicadelles vectrices : la cicadelle *Scaphoideus titanus*, seul vecteur naturel connu, et la cicadelle *Euscelidius variegatus*, vecteur expérimental à une plante hôte expérimentale, la fève *Vicia faba*.

## 1. Étude du comportement par rapport à la FD de la descendance de ceps "résistants" au vignoble

### 1.1. Préparation et entretien du matériel biologique

#### 1.1.1. Origine et multiplication du matériel végétal "résistant"

Au cours des années 1960 en Armagnac, des ceps de Baco 22A (francs de pied) sont restés indemnes de FD en dépit de la progression de la maladie. Plusieurs ceps repérés dans une parcelle dès 1962 (**Tableau 1**) ont été suivis chaque année jusqu'en 1977 (CAUDWELL et LARRUE, non publié). Ceux qui étaient restés sans symptômes chaque année au cours de ces 15 ans, ont été inoculés volontairement avec des cicadelles infectieuses installées sous manchon en 1977. Ils n'ont à nouveau montré aucun symptôme jusqu'en 1982, date à laquelle ils ont été multipliés et leur descendance installée dans un conservatoire en plein champ. Le **tableau 2** représente ces 17 lignées (ceps-fils), nommées SA1 à SA17.

En 2001, 16 des 17 têtes de lignées (SA1 à SA12, SA14 à SA17) étaient en vie et sans symptômes d'aucune maladie dégénérative. Ils ont fourni deux séries de matériel par multiplication:

- **A** : une multiplication en vert en juillet 2001 : 3 à 5 exemplaires par lignée ont été obtenus
- **B** : une multiplication en bois dormant en novembre 2001 : 5 boutures par lignée ont été établies

Tout ce matériel est conservé en serre et a été rajeuni en 2002 et 2003, par bouturage en vert.

Tableau 1. État de la parcelle-mère de Baco 22A par rapport à la FD en 1962

|        | Pas de symptômes | Symptômes variables | Attaque très grave |
|--------|------------------|---------------------|--------------------|
| Rang 1 | 36 %             | 56 %                | 8 %                |
| Rang 2 | 44 %             | 30 %                | 26 %               |
| Rang 3 | 28 %             | 52 %                | 20 %               |
| Rang 4 | 34 %             | 40 %                | 26 %               |
| Rang 5 | 58 %             | 28 %                | 14 %               |

Tableau 2. Ascendance des pieds-fils bouturés en 1982

| Ceps-fils                  | Rang et cep de la parcelle mère |        |
|----------------------------|---------------------------------|--------|
| SA1, SA2                   | Rang 1                          | Cep 16 |
| SA3                        | Rang 1                          | Cep 18 |
| SA4                        | Rang 1                          | Cep 19 |
| SA5                        | Rang 1                          | Cep 39 |
| SA6, SA7                   | Rang 2                          | Cep 11 |
| SA8, SA9, SA10, SA11, SA12 | Rang 4                          | Cep 9  |
| SA13, SA14                 | Rang 4                          | Cep 16 |
| SA15, SA16, SA17           | Rang 5                          | Cep 5  |

### 1.1.2. Origine et entretien de matériel végétal sain

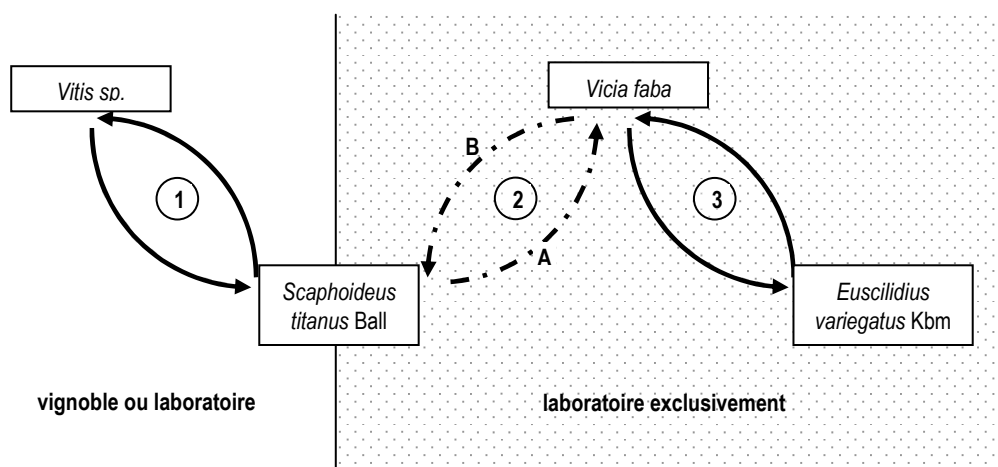
Du matériel de Baco 22A et LN33 sains (origine ENTAV) est propagé au laboratoire, par bouturage en vert. Les plants sont utilisés comme témoins sains dans la recherche de pathogènes. Ces deux cultivars sont très sensibles à la FD et peuvent être utilisés en indexage et comme témoins d'inoculation. Le matériel LN33 est utilisé pour la recherche du virus de l'écorce liégeuse (corky bark) par l'indexage

### 1.1.3. Production expérimentale de cicadelles *Scaphoideus titanus* saines ou vectrices de la FD et inoculation des boutures de vigne

Des fragments de bois de vigne de 2 ans sont récoltés chaque hiver après la taille dans des vignobles non traités aux insecticides où se développent des populations importantes de *S. titanus*. Ils portent des œufs de *S. titanus*.

**Schéma 1 : Transmission naturelle (1) et expérimentale (1, 2, 3) du phytoplasme de la FD par les cicadelles *Scaphoideus titanus*, vecteur naturel ampélophage et *Euscelidius variegatus*, vecteur expérimental ne se nourrissant pas sur la vigne.**

Le cycle (2) permet l'importation au laboratoire sur la fève (A) de phytoplasmes infectant la vigne, ou l'acquisition sur la fève par *S. titanus* (B), de phytoplasmes multipliés par le cycle (3). Ce dernier est réalisé grâce au vecteur expérimental *E. variegatus*. Les phytoplasmes ne sont pas cultivables *in vitro*. L'inoculation à la vigne ne peut être obtenue qu'avec *S. titanus*. (**cycle 1**).

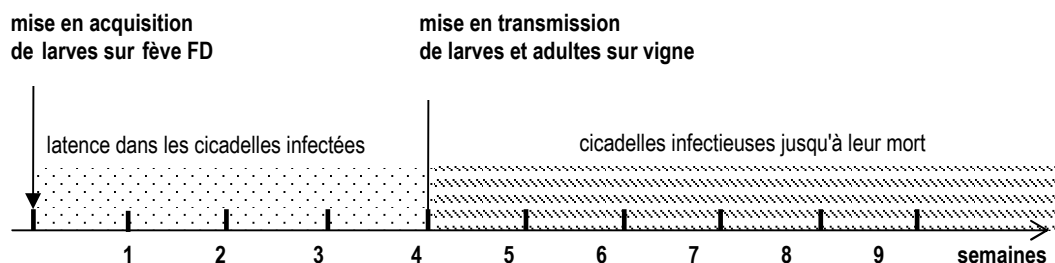


Ces bois sont conservés en chambre froide à 4 °C où la diapause de la cicadelle est assurée. Pour obtenir une colonie, suffisamment de bois (1 à 2 kg) sont disposés dans une cage d'éclosion à la



température ambiante de 22 °C en photopériode 16h/8h. Les éclosions des cicadelles *S. titanus* interviennent à partir du 21ème jour. Les insectes se développent en passant par 5 stades larvaires qui durent chacun de 8 à 10 jours et sont suivis du stade adulte de longévité allant jusqu'à 8 semaines. Le phytoplasme de la FD est multiplié au laboratoire dans des fèves infectées artificiellement par inoculation à l'aide de la cicadelle *Euscelidius variegatus* domestiquée (qui ne se nourrit pas sur vigne) (**Schéma 1, cycle 3**). Pour obtenir des *S. titanus* capables d'inoculer la vigne, des larves sont mises en acquisition par installation 1 semaine sur des fèves contaminées par la FD (**Schéma 1, cycle 2, trajet B**). Puis les larves sont à nouveau transférées aux boutures de vigne devant être inoculées (**Schéma 1, cycle 1**), à partir de la 4ème semaine depuis le début de l'acquisition, période où elles deviennent infectieuses (**Schéma 2**). Les larves et adultes ont le même régime alimentaire et sont tous utilisables pour les tests de vection, mais on privilégie de jeunes individus afin qu'ils restent en vie suffisamment longtemps après leur passage à l'état infectieux.

**Schéma 2 : Inoculation contrôlée de vignes par des larves et jeunes adultes de cicadelles *Scaphoideus titanus*, porteuses du phytoplasme de la FD après acquisition forcée sur des fèves contaminées**



## 1.2. Étude de l'état sanitaire du matériel "résistant" par rapport à la présence de virus ou de phytoplasmes latents

Le contrôle visuel ne permet de déceler aucun signe d'infection virale ou phytoplasmique.

### Recherche de phytoplasmes

Sur le matériel de la série A, 5 feuilles sont récoltées pour chaque lignée. Les nervures sont excisées et l'ADN est extrait par la méthode au CTAB (Boudon-Padiou *et al.*, 2003). La recherche de phytoplasmes est effectuée par amplification en PCR gigogne (nested-polymerase chain reaction) de régions d'ADN ribosomique des phytoplasmes, à l'aide des amorces P1/P7 pour la première amplification, et U5/U3 pour la seconde amplification (Boudon-Padiou *et al.*, 2003). Ces amorces sont dites "universelles", car elles permettent d'amplifier un fragment de l'ADN ribosomique d'environ 800 bp chez tous les phytoplasmes connus.

Deux répétitions complètes de ces tests ont été réalisées sur tous les individus de la série A. Aucun phytoplasme n'a été détecté dans aucun échantillon.

### Recherche de virus :

#### Recherche de virus par méthode ELISA

Des antisérums nous ont été fournis par le Laboratoire de virologie de la vigne de l'INRA de Colmar. Les virus recherchés sont en priorité des virus connus pour ne pas induire des symptômes visibles dans certaines situations, en particulier chez les vignes jeunes. Ainsi, les virus 1 et 3 de l'enroulement, dont on peut supposer qu'ils induiraient des symptômes visibles, ne sont pas recherchés dans un premier temps.

Les antisérums sont spécifiques pour les virus suivants.

-Néovirus associés aux maladies de dégénérescence: GFLV, ArMV, TBRV (un sérotype)

- Virus associés à l'enroulement : GLRaV-2
- Virus de la marbrure : GFkV
- Virus associé aux cannelures : GVA

Pour chaque virus, un antisérum polyclonal et un conjugué biotinylé sont disponibles.

5 grammes de feuille de chaque lignée de la série A sont soumis à l'extraction de protéines virales qui sont ensuite testées (3 puits ELISA par échantillon) pour chacun des virus ci-dessus.

#### Recherche de virus par indexage

La présence de virus associé au corky bark est recherchée par indexage des individus "résistants" SA(X) avec des greffons de LN33. Deux individus par lignée sont indexés.

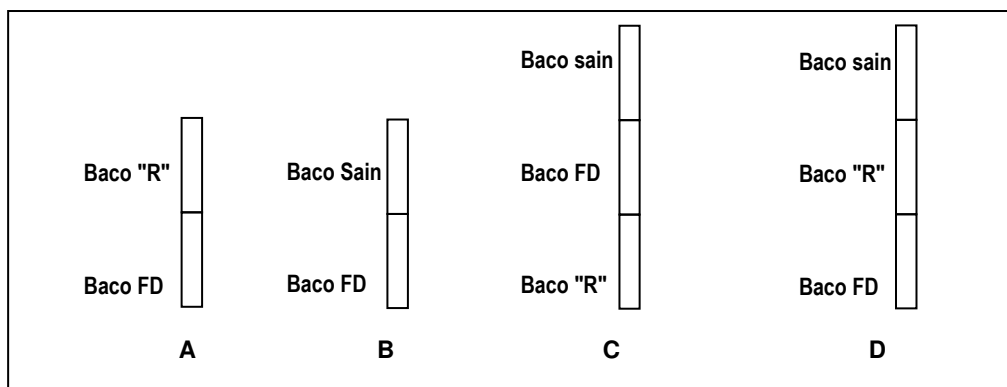
A ce jour nous n'avons aucun résultat indiquant la présence d'aucun des virus recherchés dans les lignées "résistantes".

### 1.3. Etude de la sensibilité à la FD des lignées de matériel "résistant"

L'inoculation de boutures "résistantes" à l'aide de cicadelles *S. titanus* rendues infectieuses par acquisition contrôlée de phytoplasmes de la FD, est réalisée sur des lots de 5 individus de la même lignée "résistante" SA et de 5 individus de Baco 22A sains comme témoins. Ces boutures sont placées dans une cage d'élevage de *S. titanus*, rendues infectieuses par pâturage pendant 3-4 semaines sur des fèves infectées par la FD. L'exposition des boutures de vigne à l'inoculation dure 2 semaines, puis les vignes sont retirées des cages, toutes précautions étant prises pour s'assurer de ne pas libérer de cicadelles. Les vignes sont ensuite installées en serre où l'expression de symptômes est observée. Cette dernière peut demander plusieurs mois. Si les symptômes ne s'expriment pas au cours d'une première période d'observation de 6-à 8 semaines, on provoque une dormance artificielle par arrêt de l'arrosage en conditions de température modérée. En effet, en conditions du champ, les symptômes de FD ne s'expriment le plus souvent que la 2<sup>ème</sup> année de l'inoculation, après un passage de la plante par la dormance hivernale. Il est donc parfois nécessaire de passer par un état de dormance avant d'observer les symptômes sur des vignes inoculées.

Les premières lignées inoculées sont en cours d'observation de symptômes. D'autres lignées sont en cours d'inoculation. Si des individus "résistants" sont confirmés, ils seront multipliés. Les individus fils seront soumis à de nouveaux essais d'inoculation par cicadelle ainsi que par greffage sur Baco FD (**Schéma 3, A et B**). Il sera recherché si cette "résistance" est transmissible par la greffe (**Schéma 3, C et D**).

**Schéma 3. Vérification de la résistance à l'inoculation par la greffe et essai de transmission de la protection par greffe à étage**



#### 1.4. Essais de protection de plantes herbacées contre les phytoplasmes par des éliciteurs de réaction de défense

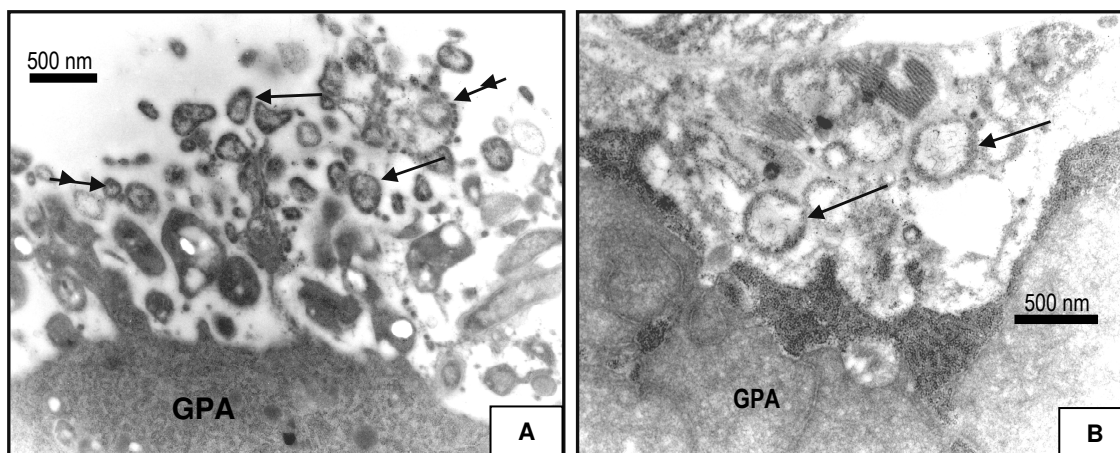
Des essais de protection contre les phytoplasmes par l'application d'éliciteurs chimiques ou biochimiques ont été entrepris. En effet, des résultats probants ont été obtenus précédemment chez le tabac infecté par le stolbur, par l'application d'élicitines (Lherminier *et al.*, 2003). Cependant les élicitines ne sont efficaces que sur les solanacées. Nous nous sommes donc tournés vers d'autres éliciteurs à large spectre. Une première molécule, l'acide  $\beta$ -amino-butyrique (BABA), qui a élicité des protections notables contre divers agents pathogènes épiphytes et sur différentes cultures, dont la vigne (COHEN *et al.*, 1999) a été appliquée à des pervenches de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Cette plante convient particulièrement bien à la transmission de phytoplasmes par la greffe et elle exprime des symptômes de phytoplasme assez rapidement (1 à 2 mois).

Des jeunes pervenches de semis ont été traitées par pulvérisation avec une solution de BABA et greffées 3 jours plus tard avec des greffons contaminés par la FD, ou avec des greffons sains comme témoins. Cinq plantes par condition ont été utilisées. Trois concentrations de BABA ont été appliquées (0,1 g/L; 0,5 g/L; 2 g/L) et un lot n'a pas été traité.

Les observations de symptômes ont été irrégulières dans le lot témoin non traité, sans doute parce que l'inoculation par greffe est difficile à standardiser. Ces résultats rendent incertains les effets de protection apparente observés dans certaines combinaisons.

Un nouveau protocole est mis en place sur des fèves inoculées par des cicadelles, pour lesquelles près de 100% de symptômes sont régulièrement obtenus. Toutefois, le choix s'était d'abord porté sur la pervenche de Madagascar car un inconvénient de la fève est la faible durée de son cycle végétatif, qui ne permet pas d'observer des effets retardés.

#### 2. Bases de la transmission spécifique du phytoplasme de la FD par la cicadelle vectrice



**Figure 1. Processus de pénétration des phytoplasmes dans les glandes salivaires d'une cicadelle vectrice.**

**A:** 3<sup>ème</sup> semaine après l'acquisition, phytoplasmes en position périphérique externe d'un acinus IV de la glande salivaire principale antérieure (GPA) de *E. variegatus*. **B:** 4<sup>ème</sup> semaine après l'acquisition, phytoplasmes dans une vacuole périphérique de l'acinus IV de la GPA. (Photos S. Guegneau et J. Lherminier). Flèche simple, formes conventionnelles; flèche double, formes vésiculaires

Le trajet du phytoplasme dans le corps de l'insecte a été étudié sur différents modèles. L'une des approches les plus achevées a été obtenue sur la cicadelle *Euscelidius variegatus* et le schéma de transmission contrôlée du phytoplasme de la FD (Boudon-Padieu *et al.*, 1989; Lefol *et al.*, 1993, 1994. Plusieurs des conclusions obtenues sur ce modèle ont été confirmées pour *S. titanus* et la FD : la pénétration des glandes salivaires est le dernier élément clé de la transmissibilité; des systèmes de reconnaissance cellulaires peuvent être invoqués (Lefol *et al.*, 1993); il se réalise aux environs de la 4<sup>ème</sup> semaine suivant la mise en acquisition; c'est un phénomène actif au cours duquel les phytoplasmes sont internalisés dans des vacuoles d'endocytose par des cellules sécrétrices de la salive (acinus des glandes salivaires antérieurs principales (GPA). La **figure 1** (A et B) (Guegneau et Lherminier, non publié) montre deux événements successifs de ce processus.

La recherche de marqueurs de l'infection des cicadelles s'avère donc cruciale pour étudier et mieux comprendre, d'une part, la reconnaissance insecte vecteur-phytoplasme, et d'autre part les mécanismes conduisant à l'invasion des cellules de l'insecte par les phytoplasmes.

Au sein des phytoplasmes viticoles, la FD *sensu stricto* appartient au groupe de la Jaunisse de l'orme (16SrV) et est transmise par *S. titanus*. D'autres phytoplasmes viticoles associés à la jaunisse Palatinatae grapevine yellows (PGY) appartenant au même groupe, ont été identifiés en Allemagne où *S. titanus* ne vit pas (Maixner *et al.*, 2000). Enfin, plusieurs souches de phytoplasmes appartenant au même groupe 16SrV sont des phytoplasmes isolés d'arbres forestiers et d'arbustes, en Amérique, Europe et Asie. La comparaison du génome de ces phytoplasmes ainsi que de leurs principaux antigènes, les protéines membranaires, nous indiqueront si des traits particuliers peuvent être associés à la transmission par la cicadelle *S. titanus*.

Les comparaisons de onze isolats de phytoplasmes du groupe 16SrV, parmi lesquels 4 isolats de FD *sensu stricto* et 3 isolats de PGY, basées sur l'homologie entre un fragment d'ADN génomique non ribosomique et un fragment d'ADN ribosomique, indiquent que les phytoplasmes de la FD appartiennent à un cluster nettement distinct (Angelini *et al.*, 2001; 2003).

Des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre le phytoplasme de la FD (Boudon-Padieu *et al.*, 1989; Seddas *et al.*, 1996) sont utilisés en Western blotting (WB), Far western blotting (FWB) et Far western blotting inverse (FWBI) (**Tableau 3**) pour tenter de voir si les protéines membranaires majeures du phytoplasme de la FD sont impliquées dans les phénomènes d'attachement du phytoplasme aux organes de la cicadelle et pour mettre en évidence les sites moléculaires des organes de la cicadelle impliqués dans cette reconnaissance (Desqué, 2003).

**Tableau 3. Protocole WB, FWB et FWBI et visualisation potentielle des récepteurs**

| Protocole | protéines séparées et transférées                 | incubation 1                      | incubation 2      | protéines mises en évidence                                                                                      |
|-----------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WB        | cicadelles FD<br>(témoins :<br>cicadelles saines) | anticorps anti FD                 | /                 | protéines membranaires du<br>phytoplasme – détection directe                                                     |
| FWB       | cicadelles saines                                 | suspension de<br>phytoplasmes     | anticorps anti FD | protéines de l'insecte ligand des<br>phytoplasmes -<br>détection indirecte                                       |
| FWBI      | cicadelles FD                                     | protéines de cicadelles<br>saines | anticorps anti-FD | par défaut : protéines de<br>phytoplasme impliquées dans<br>l'attachement sur l'insecte :<br>comparaison avec WB |

La révélation en WB des protéines de phytoplasmes permet de caractériser les isolats de FD, de comparer cette caractérisation avec l'arbre de parenté fourni par les comparaisons génomiques et de voir quels sont leurs traits communs et leurs différences

Le FWB peut permettre d'accrocher sur une membrane où les protéines de cicadelles séparées en électrophorèse ont été transférées, des phytoplasmes de FD purifiés, par les sites de reconnaissance phytoplasme – cicadelle.

Le FWBI consiste à transférer sur membrane des protéines de cicadelles infectées et à incuber cette membrane avec des protéines de cicadelles saines, puis avec des anticorps anti-phytoplasme FD. Ces derniers ne s'accrocheront pas aux antigènes homologues de phytoplasmes présents sur la membrane si ces derniers contiennent des sites affins aux protéines de cicadelle saine incubées précédemment.

FWB et FWBI peuvent donc permettre de démontrer l'existence d'interactions protéine-protéine (P-P) entre le phytoplasme et les organes de la cicadelle. Les bandes d'intérêt sur les membranes pourront être séparées en électrophorèse 2D et préparative aux fins de caractérisation moléculaire et de recherche de gènes homologues dans le génome du phytoplasme.

Il faut rappeler que les phytoplasmes ne sont pas cultivables et donc l'importance du cycle de production expérimental (**Schéma 1, cycle 3**) qui permet de multiplier 3 isolats de FD, nommés FD70, FD92 et FD2000).

Les résultats (Desqué, 2003) indiquent en WB une variabilité sérologique entre les trois isolats de phytoplasmes de FD (**Figure 2**). Le FWB n'a pour l'instant pas permis de montrer l'existence d'interactions P-P. Une concentration insuffisante des extraits de phytoplasmes, qu'il est très difficile d'obtenir à l'état pur) utilisés pour l'incubation des membranes, peut être mise en cause. Par contre, le FWBI a donné des résultats encourageants, indiquant que de telles interactions existent (résultats non illustrés).

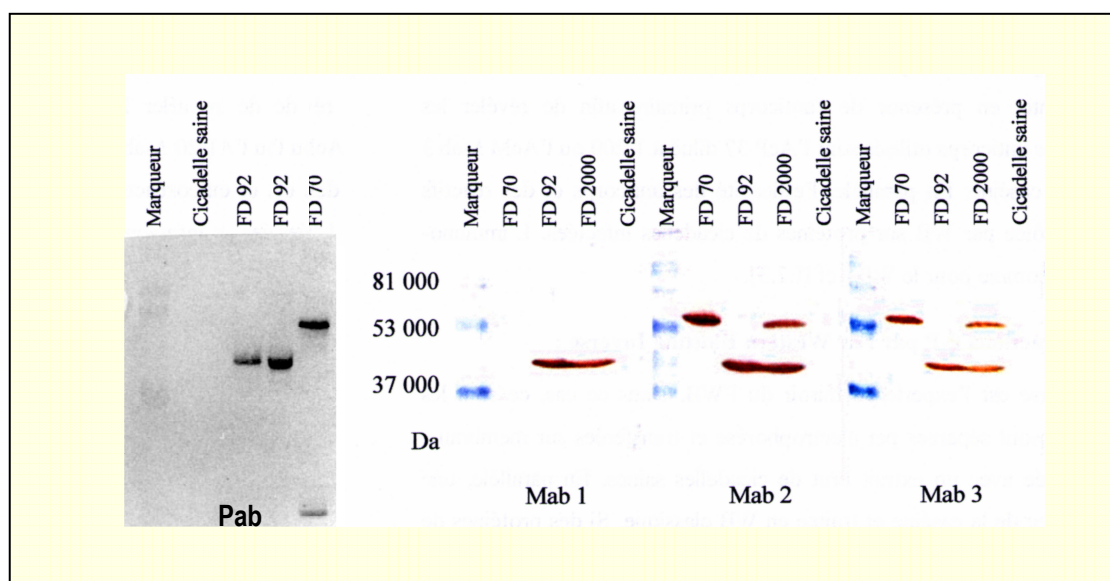


Figure 2. Réponse en WB d'anticorps polyclonaux (Pab) et monoclonaux (Mab) anti-FD sur protéines de cicadelles infectées par l'un des 3 isolats de FD entretenus au laboratoire

Les travaux se poursuivent pour optimiser le rendement des différentes techniques de purification des phytoplasmes et la sensibilité du marquage en favorisant les interactions, pour cribler de nouveaux anticorps d'intérêt et pour appliquer ces méthodes à des séparations de protéines en 2D.

## Conclusion

Les problèmes posés par la FD en santé des plantes sont particulièrement ardues du fait de la complexité de la biologie et de la transmission de l'organisme phytopathogène. La viticulture biologique, mais aussi les conduites conventionnelles et raisonnées attendent des solutions permettant de limiter la gravité des attaques de FD et de pouvoir ainsi vivre avec un niveau tolérable de maladie dont les épidémies pourraient être maîtrisées.

Les recherches conduites sur les phytoplasmoses doivent être conduites sur tous les plans : agronomie, physiologie, entomologie, épidémiologie, bactériologie, biologie moléculaire. La FD bénéficie pour ces recherches des résultats de travaux conduits depuis plusieurs décennies à l'INRA et de comparaisons avec les travaux réalisés depuis une dizaine d'années dans d'autres pays, en particulier en Italie qui connaît maintenant des attaques comparables à la France.

Ainsi, l'étude de la FD bénéficie-t-elle de la connaissance de la cicadelle vectrice naturelle, éleveable pendant la phase active de son cycle (de l'œuf à l'adulte), de la modélisation de la transmission, d'outils avancés, bien que perfectibles, de détection et de caractérisation, qui ont démontré une grande homogénéité biologique et moléculaire entre les isolats de phytoplasmes de FD *sensu stricto*.

Parmi les obstacles au progrès de la recherche, nous trouvons en première ligne la lourdeur expérimentale, due à la longueur des temps nécessaires pour l'expression des symptômes et la mise en place de réactions de défense (postulées), à la complexité et la grande diversité du matériel végétal, cépages et porte-greffes, et à l'impossibilité de l'expérimentation en plein champ, nécessaire à l'expression du comportement et à la sélection de matériel intéressant, mais qui se heurte aux exigences de la prophylaxie et en tout état de cause à la législation qui frappe cette maladie de quarantaine.

Dans ce contexte, l'étude du comportement des ceps résistants, abordée dans une démarche exploratoire, est fatalement inachevée. Il s'agit là de travaux non conventionnels, qui se devaient d'être entrepris et devront être poursuivis car si la "résistance" et le rétablissement de ceps sont connus depuis plusieurs décennies, leur étude n'avait jusqu'alors été que descriptive et les phénomènes ne sont pas compris. Les premiers résultats obtenus ne sont que fragmentaires en raison de la lourdeur expérimentale des essais et du temps nécessaire à la lecture des résultats pour ce qui est de l'indexage, de l'inoculation contrôlée et de la transmission par la greffe. Toutefois les travaux se poursuivent actuellement grâce à la disponibilité des 16 lignées de matériel "résistant" entretenues. Il faut dire que dans les contraintes actuelles de la lutte obligatoire, l'identification de tel matériel serait aujourd'hui impossible.

L'élucidation de mécanismes de défense réalisée sur tabac est un phénomène prometteur. Même si le décryptage des phénomènes cellulaires qui les gouvernent est une problématique très lointaine du fait de sa complexité, l'obtention de protection pourrait être rapidement utilisée sur un plan pratique, dans la mesure où les éliciteurs retenus sont écologiquement neutres.

La connaissance de la spécificité de la vécution sera poursuivie par le repérage des protéines d'intérêt, leur séquençage partiel, la construction de sondes et la recherche de gènes homologues dans les banques de données. D'autres approches de génomique du phytoplasme sont en cours, comme l'isolement du chromosome entier, l'établissement d'une carte physique (Constable et Boudon-Padieu, 2003) et la localisation de gènes connus ou bien de fragments clonés au hasard.

L'identification des interactions spécifiques cicadelle-phytoplasme pourra permettre des actions préventives. Pourra s'avérer nécessaire la mise en place de méthodes de limitation des populations de *S. titanus* en zone indemne de FD, dans le cas où il serait démontré qu'un phytoplasme non viticole présent dans l'environnement pourrait être propagé activement par *S. titanus* après son introduction accidentelle à la vigne par un insecte vecteur ampélophage occasionnel. Une autre perspective serait l'utilisation de leurres absorbés par les cicadelles et saturant sur les barrières cellulaires les sites spécifiques de l'accrochage du phytoplasme.

## Bibliographie

- ANGELINI, E.; CLAIR, D.; BORGIO, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON-PADIEU, E. (2001). Flavescence dorée in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40, 79-86.
- ANGELINI, E.; NEGRISOLO, E.; CLAIR, D.; BORGIO, M.; BOUDON-PADIEU, E. (2003). Phylogenetic relationships among Flavescence dorée isolates and related phytoplasmas determined by Heteroduplex Mobility Assay and sequences of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Plant Pathology*, 52, 663-672.
- ARRÊTÉ DU 9 JUILLET 2003 relatif à la lutte contre la flavescence dorée de la vigne et contre son agent vecteur. *Journal officiel de la République française*, 167, 22 juillet 2003.
- BOUDON-PADIEU, E.; LARRUE, J.; CAUDWELL, A. (1989). ELISA and Dot-Blot detection of Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19:357-364.
- BOUDON-PADIEU, E. (2000)a. Les jaunisses à phytoplasmes. In : Maladies à virus, phytoplasmes et bactériennes de la vigne. Editions FERET, Bordeaux, 121-167.
- BOUDON-PADIEU, E. (2000)b. La cicadelle vectrice de la Flavescence dorée, *Scaphoideus titanus* Ball, 1932. In : Ravageurs de la vigne, Editions FERET, Bordeaux, 110-120.
- BOUDON-PADIEU, E. (2002). Flavescence dorée of the grapevine: knowledge and new developments in epidemiology, etiology and diagnosis. *ATTI Giornate Fitopatologiche 2002*, 15-34.
- BOUDON-PADIEU, E.; BÉJAT, A.; CLAIR, D.; LARRUE, J.; ANGELINI, E. (2003). Grapevine yellows : comparison of different procedures for DNA extraction and amplification for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis*, 42, 141-149.
- CASTELAIN, C.; CHASTELLIÈRE, M.G.; JULLIAN, J.P.; MORVAN, G.; LEMAIRE, J.M. (1997). La prémunition contre l'enroulement chlorotique de l'abricotier. Bilan de dix années d'observations sur huit vergers. *Phytoma – La Défense des Végétaux*, 493, 39-44.
- CAUDWELL, A. (1962). Six années de recherches sur la Flavescence dorée. *Agriculture* 248, 249-251.
- CAUDWELL, A. (1961). Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la Vigne. *Annales des Epiphyties*, 12 (3), 347-354.
- CAUDWELL, A.; LARRUE, J. (1987). Schéma de l'évolution de la Flavescence dorée chez la vigne et du développement de la cicadelle vectrice : les périodes critiques. *Progrès Agricole et Viticole*, 1er mai 1987, 216-217 et 15 juin 1987, 290.
- CAUDWELL, A.; KUSZALA, C. (1994). Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de Flavescence dorée. *Research in Microbiology*, 143, 791-806.
- CAUDWELL, A.; POITOU, N. (1960). Interaction entre Court-noué et Flavescence dorée. *Comptes rendus des séances de l'Académie d'Agriculture de France*, 46, 958-963.
- CLAIR, D.; LARRUE, J.; AUBERT, G.; GILLET, J.; CLOQUEMIN, G.; BOUDON-PADIEU, E. 2003. A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42 (3), 151-157.
- COHEN, Y.; REUVENI, M.; BAIDER, A. (1999). Local and systemic activity of BABA (DL-3aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 351-361.
- CONSTABLE, F.; BOUDON-PADIEU, E. (2003). Genomic diversity of the Flavescence dorée phytoplasma. *14th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus diseases of Grapevine (ICVG)*. Locorotondo (BARI), Italy. 12-17 Sept. 2003. Extended abstracts, 81.
- DAIRE, X.; CLAIR, D.; REINERT, W.; BOUDON-PADIEU, E. (1997). Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 507-514.

- DESQUÉ, D. (2003). Contribution à l'étude de la transmission des phytoplasmes par les insectes vecteurs: recherche de marqueurs protéiques de la spécificité de la transmission. *Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire. Sciences de la vie et de la Santé. Université de Bourgogne.*
- LEFOL, C.; CAUDWELL, A.; LHERMINIER, J.; LARRUE, J. (1993). Attachment of the Flavescence dorée Pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of Applied Biology*, 123, 611-622.
- LEFOL, C.; LHERMINIER, J.; BOUDON-PADIEU, E.; LARRUE, J.; LOUIS, C.; CAUDWELL, A. (1994). Propagation of the Flavescence dorée MLO (Mycoplama-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63, 285-293.
- LHERMINIER, J.; BOUDON-PADIEU, E. (1996). *In situ* detection of Grapevine Flavescence dorée phytoplasmas and their infection cycle in experimental and natural host plants. In : Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganisms Interactions, M. Nicole and V. Gianinazzi-Pearson, Ed. Kluwer academic publishers, The Netherlands. pp. 245-256.
- LHERMINIER, J.; BONFIGLIOLI, R.G.; DAIRE, X.; SYMONS, R. H.; BOUDON-PADIEU, E. (1999). Oligodeoxynucleotides as probes for in situ hybridization with transmission electron microscopy to specifically localize phytoplasma in plant cells. *Molecular and cellular probes*, 13, 41-47.
- LHERMINIER, J.; BENHAMOU, N.; LARRUE, J.; BOUDON-PADIEU, E.; MILAT, M-L.; BLEIN, J-P. (2003). Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology*, 93, 1308-1319.
- MAIXNER, M.; REINERT, W.; DARIMONT, H. (2000). Transmission of Palatinate grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis*, 39(2), 83-84.
- SCHWARTZ, Y. (1984). La lutte biologique contre les maladies à mycoplasmes. Méthodes sérologiques applicables à la recherche des népovirus antagonistes et application aux mycoplasmes de la vigne. *Diplôme d'études approfondies des Sciences de la vie, Université de Dijon.*
- SEDDAS, A.; MEIGNOZ, R.; DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E. (1996). Generation and characterization of monoclonal antibodies to Flavescence dorée phytoplasma : serological relationships and differences in electroblot immunoassay profiles of Flavescence dorée and Elm yellows phytoplasmas. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 757-764.