

Flavescence dorée. Quels sont les réservoirs du phytoplasme ? Quelle sensibilité des cépages ? Peut-on bloquer la transmission par la cicadelle ?

XAVIER FOISSAC¹, SANDRINE EVEILLARD¹, JEAN MASSON², NATHALIE ARRICAU-BOUVERY¹
ET SYLVIE MALEMBIC-MAHER¹

¹ UMR Biologie du Fruit et Pathologie, INRAE, Univ. Bordeaux, Villenave d'Ornon F-33882

² UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin, INRAE, Université de Strasbourg, Colmar 68000

Email: sylvie.malembic-maher@inrae.fr

La Flavescence dorée (FD) est une maladie de quarantaine de la vigne, causée par un phytoplasme et transmise par la cicadelle *Scaphoideus titanus*. Parce qu'elle impacte la production, voire la pérennité des exploitations lorsque les mesures de lutte ne sont pas appliquées à temps, la FD fait partie des causes du dépérissement du vignoble. Nous présentons ici plusieurs résultats des projets CO-ACT et RISCA (Plan National contre le Dépérissement du Vignoble) qui avaient pour ambition :

1. D'évaluer les risques d'émergence de la maladie depuis l'environnement des vignobles, puis de se doter d'outils pour les prévenir
2. D'envisager de nouveaux moyens de lutte par la compréhension des différences de sensibilités des cépages et des mécanismes de transmission du phytoplasme par le vecteur.

Ces études ont reposé sur un partenariat entre des chercheurs INRAE et les principaux acteurs de la lutte contre la maladie (SRALs, FREDONS, GDONS, Chambres d'Agriculture et interprofession) dans les vignobles du Bordelais et de Bourgogne.

Les risques d'émergence de la maladie depuis les aulnes et les clématites présents aux abords des vignobles sont limités.

Les chercheurs ont longtemps pensé que le phytoplasme était restreint à la vigne et qu'il avait été introduit avec cette plante, tout comme sa cicadelle vectrice, depuis le continent Nord-Américain. Mais des études récentes ont montré que les aulnes européens, bien qu'asymptomatiques, renferment un grand nombre de variants génétiques de la bactérie et constituent son réservoir originel (Malembic-Maher et al. 2020). Ces variants sont propagés par des cicadelles de l'aulne autres que *S. titanus* (*Oncopsis alni*, *Allygus spp.*, *Orientalus ishidae*) qui les transmettent occasionnellement à la vigne. Ce transfert est rare et ces cicadelles ne propagent pas les phytoplasmes de vigne à vigne. Mais une fois transmis à la vigne, quelques variants du phytoplasme, qui présentent des adhésines de surface qui lui permettent d'envahir *S. titanus*, sont épidémiques au vignoble. L'hypothèse est aujourd'hui que l'émergence des épidémies de FD a résulté de la rencontre entre cette cicadelle d'Amérique du nord et ces variants par-

ticuliers endémiques des aulnes européens. D'autres plantes de l'environnement des vignobles comme les clématites peuvent constituer des réservoirs secondaires de phytoplasmes FD (Malembic-Maher et al. 2020). Le cycle écologique de la maladie dont on voit aujourd'hui le développement aux vignobles implique les vignes et leurs environnements, où le phytoplasme est déjà présent, même dans les zones exemptes de FD. Toutefois, comme les transferts depuis les aulnes et les clématites sont rares, il n'est pas nécessaire d'éliminer ces plantes aux abords des vignobles.

En appui aux analyses de risques pour moduler la lutte insecticide, nous avons transféré vers les laboratoires d'analyse le test de génotypage des phytoplasmes basé sur le gène *map* qui permet de tracer les variants génétiques du phytoplasme dans les vignobles et leurs environnements et de déterminer l'origine des cas de FD au vignoble.

Les risques d'émergence ou de réémergence de la maladie depuis les vignes non cultivées sont élevés.

Dans les zones contaminées par la FD, les repousses ensauvagées de porte-greffe (RPG) peuvent être infectées par le phytoplasme sans présenter de symptômes. Elles peuvent également héberger *S. titanus*, capable de migrer vers les parcelles cultivées (Eveillard et al. 2016 ; Lessio et al. 2014). Ni surveillées ni traitées aux insecticides, leur présence augmente fortement les risques de (ré)émergence de maladie sur les parcelles voisines (Ripamonti et al. 2020). Le livret VitisObs a été finalisé lors de ce projet. Il a pour but d'informer les vignerons et les riverains sur les risques de réservoirs de FD et les possibilités de gestion des *Vitis* problématiques. L'objectif de cette étude était d'évaluer la perception du livret auprès de ces publics ainsi que son efficacité sur 2 communes viticoles du Bordelais présentant des foyers de FD chroniques et des *Vitis* réservoirs en abondance. Les études ont été menées en collaboration avec les équipes municipales et les GDONS des Bordeaux et du Sauternais-Graves. Le livret a été distribué en même temps que la brochure municipale auprès des particuliers ainsi qu'aux viticulteurs. Précédant cette distribution, les différents types de *Vitis* réservoirs (RPG, vigne abandonnées et vignes de jardin) ont été recensés et cartographiés sur ces territoires.

L'analyse cartographique a permis de déterminer que les *Vitis* sont présents à une densité importante, variant de 7 à 60 polygones/km² en fonction des zones. Les RPG représentent la grande majorité des points recensés et plus de 50 % sont présents chez des particuliers. Ceci vient confirmer la pertinence d'informer également les riverains. Suite à la diffusion du livret, une enquête a été réalisée auprès de 205 domiciles situés, d'après la cartographie, sur des zones avec des *Vitis* réservoirs. Un quart des sondés a déclaré avoir reçu et lu le livret. Au final, 9 personnes ont « agi » sur la seule base de la lecture du livret, en éliminant les *Vitis* ou en contactant la mairie. L'enquête réalisée auprès des 50 viticulteurs situés sur les 2 communes a montré, quant à elle, que 31 avaient bien reçu et lu le livret mais aucun n'avait agi suite à sa lecture. Les raisons principales invoquées étaient qu'ils se considéraient déjà informés et/ou qu'ils n'avaient pas de *Vitis* sur leur propriété. Plus du tiers, signalait tout de même la présence abondante de *Vitis* dans l'entourage de leurs parcelles et 2/3 soulignait l'importance de la sensibilisation des particuliers à cette problématique.

Les cépages peu sensibles à la FD peuvent être identifiés et leurs caractères favorables sont transmis lors de croisements.

Les études de terrain ont montré que le Cabernet Sauvignon est très sensible à la maladie alors que le Merlot est peu sensible. L'enjeu du programme est de déterminer sur quoi reposent de telles différences, en concevant un test de phénotypage précis. Avec celui-ci, il s'agissait d'évaluer la sensibilité de 28 cépages, porte-greffe et vitacées sauvages, puis d'identifier des traits génétiques potentiels pouvant expliquer ces phénotypes. Le test implique l'insecte vecteur, le phytoplasme et la vigne et, ainsi, mime, les conditions naturelles du vignoble. Mis au point en serre de confinement et utilisant du matériel végétal issu de culture in vitro, il permet de déterminer le pourcentage de plantes infectées par les cicadelles, et la quantité de phytoplasmes dans la plante (Eveillard et al. 2016). Avec ces deux valeurs, nous avons classé 28 vitacées en 3 catégories : peu sensibles (Pinot Noir, Merlot, Syrah, Magdeleine Noire des Charentes, Kober 5BB, Nema-dex Alain Bouquet), moyennement sensibles (Grenache, Cabernet Franc, Chardonnay, 3309 Couderc, 110 Richter, Sélection Oppenheim n°4, 41B Millardet et de Grasset) et très sensibles (Cabernet Sauvignon, Sauvignon et Riparia Gloire de Montpellier).

Les mesures réalisées en vignoble et en serre de confinement confirment que le pourcentage de plantes infectées, le nombre de rameaux infectés sur chaque plante et la quantité de phytoplasmes dans les rameaux infectés sont plus faibles chez le Merlot que chez le Cabernet Sauvignon. Les études moléculaires suggèrent que les défenses du Merlot réagissent différemment de celles du Cabernet Sauvignon, face à cette maladie.

Des études préalables de génétique (Boursiquot et al. 2009) et cette étude de phénotypage ont montré que le croisement de la Magdeleine Noire des Charentes,

peu sensible, avec le Cabernet Franc, moyennement sensible, a donné un cépage peu sensible : le Merlot. Ce croisement a été réalisé à nouveau ainsi que des autofécondations de la Magdeleine. Le phénotypage de descendants met en évidence 4 types des plantes ayant un faible (ou) fort taux d'infection combiné à un faible (ou) fort taux de multiplication du phytoplasme. Il y a donc au moins deux QTLs impliqués dans la réponse de la vigne à la FD. Le phénotypage montre également que l'on peut produire d'autres variétés peu sensibles comme le Merlot. La réponse de ces descendants face aux maladies de la vigne et aux stress du climat pourra être étudiée.

Les connaissances phénotypiques et génétiques pourraient aider à la création de nouveaux cépages combinant des résistances à plusieurs pathogènes de la vigne pour une viticulture mieux-disante au niveau environnemental. Mais, déjà, nos résultats peuvent aider les viticulteurs à mieux choisir les cépages à planter, et limiter ainsi la propagation de la FD en complément des autres mesures de lutte.

Une inhibition de la synthèse de clathrine, protéine probablement impliquée dans le processus d'entrée des phytoplasmes dans les cellules de l'insecte, perturbe le processus d'invasion du vecteur.

Suite à son ingestion à partir d'une vigne infectée, le phytoplasme doit coloniser et traverser les barrières de l'intestin puis des glandes salivaires de la cicadelle vectrice avant d'être transmis à une nouvelle plante. Cette « circulation » implique des interactions fines entre le phytoplasme et les cellules de la cicadelle (Arricau-Bouvery et al. 2018, 2021). Nous travaillons au décryptage des mécanismes moléculaires qui gouvernent ces interactions avec pour objectif de bloquer le processus d'entrée et de reconnaissance du phytoplasme et inhiber ainsi sa transmission.

En utilisant différentes techniques d'étude des interactions protéines-protéines in vitro et in vivo, nous avons recherché les protéines de la cicadelle auxquelles se fixent les adhésines du phytoplasme de la FD. Ces travaux ont été réalisés chez la cicadelle vectrice expérimentale du phytoplasme FD, *Euscelidius variegatus*. Nous avons notamment identifié les protéines adaptatrices AP-1 et AP-2, qui permettent l'endocytose clathrine dépendante et donc l'entrée du phytoplasme dans les cellules de l'insecte vecteur. En les faisant se nourrir sur des milieux artificiels, nous avons fait ingérer par les cicadelles, des molécules d'ARN double brins ayant la même séquence que les ARN messagers de la clathrine. Par un mécanisme de défense de l'insecte faisant intervenir des petits ARN inhibiteurs (Galletto et al., 2019), ceci a entraîné une diminution d'un facteur 9 de la synthèse des ARN messagers codant pour la clathrine dans l'intestin moyen, avec une efficacité se poursuivant sur une dizaine de jours.

En faisant ensuite ingérer aux cicadelles les phytoplasmes sur des plantes infectées, nous avons montré que la concentration du phytoplasme est réduite de 2.5 fois dans l'intestin de ces insectes. Nous faisons l'hypothèse que la diminution de l'expression du gène de clathrine entraîne une limitation de l'entrée des phytoplasmes dans les intestins. Les essais pour mesurer l'impact de cette inhibition sur la circulation dans l'insecte et la transmission du phytoplasme sont en cours.

Références bibliographiques :

*Abbà, S., Galetto, L., Ripamonti, M., Rossi, M., and Marchi, C., 2019. RNA interference of muscle actin and ATP synthase beta increases mortality of the phytoplasma vector *Euscelidius variegatus*. *Pest Manag Sci* 75: 1425–1434.

*Arricau-Bouvery, N., Duret, S., Dubrana, M.-P., Batailler, B., Desqué, D., Béven, L., et al., 2018. Variable membrane protein A of *flavescence dorée* phytoplasma binds the midgut perimicrovillar membrane of *Euscelidius variegatus* and promotes adhesion to its epithelial cells. *Appl Env Microbiol* 84: e02487-17.

*Arricau-Bouvery, N., Duret, S., Dubrana, M.-P., Desqué, D., Eveillard, S., Brocard, L., et al. 2021. Interactions between the *flavescence dorée* phytoplasma and its insect vector indicate lectin-type adhesion mediated by the adhesin *VmpA*. *Sci Rep* 11: 11222.

*Boursiquot, J.-M., Lacombe, T., Laucou, V., Julliard, S., Perrin, F.-X., Lanier, N., et al., 2009. Parentage of Merlot and related winegrape cultivars of southwestern France: discovery of the missing link. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 144–155. doi: 10.1111/j.1755-0238.2008.00041.x

*Eveillard, S., Jollard C., Labroussaa, F., Khalil, D., Perrin, M., Desque, D., et al., 2016. Contrasting Susceptibilities to *Flavescence Doree* in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild *Vitis* Species. *Front. Plant Sci.*; 7, 1762.

*Lessio, F., Tota, F. and Alma, A., 2014. Tracking the dispersion of *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) from wild to cultivated grapevine: Use of a novel mark-capture technique. *B. Entomol. Res.*, 104(4), 432–443.

*Malembic-Maher, S., Desque, D., Khalil, D., Salar, P., Bergé, B., Danet, J.-L., et al., 2020. When a Palearctic bacterium meets a Nearctic insect vector: genetic and ecological insights into the emergence of the grapevine *Flavescence dorée* epidemics in Europe. *PLOS Pathog.*, 16(3), e1007967.

*Ripamonti, M., Pegoraro, M., Rossi, M., Bodino, N., Beal, D., et al., 2020. Prevalence of *Flavescence Doree* phytoplasma-infected *Scaphoideus titanus* in different vineyard agroecosystems of Northwestern Italy. *Insects*, 11(5), 301.