

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Biologie des Organismes

Détermination d'une gamme de sensibilité à la Flavescence dorée au sein du genre *Vitis*.

SAGARDUY, Maialen

Stage effectuée du 5 mars au 1^{er} juin 2012 à
UMR 1332 INRA et Université Bordeaux- 71 avenue E.Bourleaux-B.P 81
33883 VILLENAVE D'ORNON CEDEX
sous la direction scientifique de Mme EVEILLARD Sandrine



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

REMERCIEMENTS

Voilà que trois mois viennent de s'écouler et je me dois de remercier toutes celles et ceux, qui de près ou de loin ont contribué au bon déroulement de mon stage.

Je tiens d'abord à remercier Benoît Fauconneau, président du centre INRA pour m'avoir permis d'y effectuer mon stage.

Je remercie Joël Renaudin, responsable de l'équipe Mollicutes pour m'avoir permis de travailler au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier Sandrine Eveillard, pour sa patience, son écoute, sa présence, qui a su me guider tout au long de mon stage.

Je remercie Sylvie Malembic-Maher pour m'avoir permis de participer à son projet.

Je remercie également toute l'équipe des Mollicutes, qui a contribué au bon déroulement de mon stage.

AVANT-PROPOS

Issue de la fusion au 1^{er} janvier 2011 des UMR 619 “Biologie du Fruit” et 1090 “Génomique, Diversité et Pouvoir Pathogène”, l’UMR 1332 “Biologie du Fruit et Pathologie” rassemble aujourd’hui un peu plus de 120 personnes travaillant dans le grand domaine des Sciences du Végétal. L’UMR 1332 est un partenariat entre l’INRA [Départements de Biologie Végétale (BV), Santé des Plantes et Environnement (SPE) et Génétique et Amélioration des Plantes(GAP)] et les Universités Bordeaux 1 et Bordeaux Ségalen. Elle est membre de la Structure Fédérative de Recherche “Biologie Intégrative et Ecologie”.

Les recherches s’inscrivent dans deux axes historiques forts, l’étude du développement précoce du fruit et la mise en place des critères de qualité des fruits charnus, et l’étude de pathogènes non cultivables de plante (virus et mollicutes) et de leurs interactions avec leurs plantes hôtes ou leurs vecteurs.

J’ai effectué mon stage au sein de l’équipe Mollicutes, dont l’objectif général est de produire des connaissances fondamentales sur l’évolution des génomes de mollicutes et sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent les interactions de ces bactéries "minimales" avec leurs hôtes eucaryotes. Une part de leurs activités, plus finalisée, est également consacrée à l’étiologie et l’épidémiologie des bactérioses du phloème émergentes.

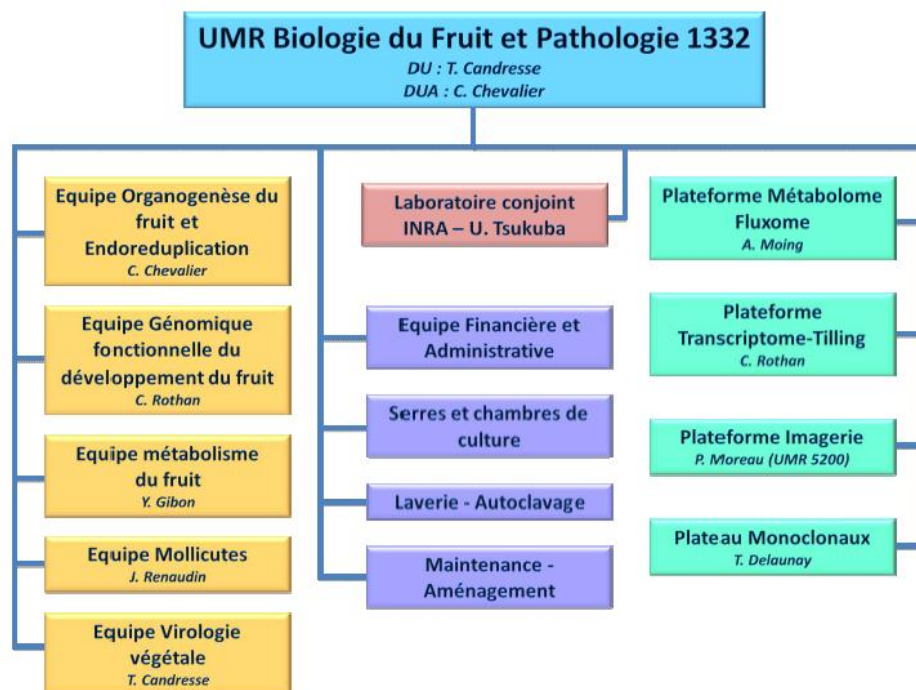


Figure 1 : Organigramme de l’UMR BFP 1332

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **1**

MATERIELS ET METHODES **5**

I. Matériel végétal

- 1/ Vignes de terrain
- 2/ Vignes de serre de Haut Confinement

II. Matériel animal

- 1/ Les insectes

III. Protocole d'extraction d'ADN

- 1/ Protocole d'extraction d'ADN des échantillons végétaux de serre de HC
- 2/ Protocole d'extraction d'ADN des échantillons végétaux de terrain.
- 3/ Protocole d' extraction d'ADN des insectes

IV. PCR quantitative

- 1/ Principe
- 2/ Protocole

V. Analyses statistiques

RESULTATS **11**

I/ Quantification du phytoplasme de la flavescence dorée dans les vignes de terrain

II/ Quantification du phytoplasme de la flavescence dorée dans les vignes de serre de haut confinement

- 1/ Manipulation n°3 (CIVB 3)
- 2/ Manipulation n°4 (CIVB 4)
- 3/ Manipulation n°5 (CIVB 5)
- 4/ Etablissement d'une gamme de sensibilité

CONCLUSION-DISCUSSION **19**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **21**

ANNEXES **22**

INTRODUCTION

Dans les années 1949-1950, des viticulteurs du Sud-Ouest de la France (Chalosse, Bas Armagnac) constatent que leurs vignes souffrent de jaunisses et dépérissent. C'est la première apparition de la Flavescence dorée. Des études ont été menées pour caractériser cette maladie car il existe d'autres maladies s'exprimant par des jaunisses (autres pathogènes, stress abiotique tel que des carences). Durant les années qui suivirent, la maladie s'est répandue à raison de 5 à 10 kilomètres par an, vers les Landes et le Gers, puis les Hautes Pyrénées et le Lot et Garonne. Après s'être étendue, elle est actuellement présente dans différents pays du Sud de l'Europe. Sur le territoire français, la maladie est présente là où l'insecte vecteur trouve les conditions qu'il lui faut pour vivre : pour des raisons de climat, elle ne se rencontre pas au Nord de la Loire. Bien entendu, il a fallu du temps pour déterminer son étiologie. On a d'abord pensé à un étouffement des racines (maladie du rougeau physiologique). On a ensuite émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'une pathologie liée à un virus (symptômes, caractère épidémique, absence d'agents pathogènes dans les tissus de la plante). L'agent pathogène, le phytoplasme, n'a été identifié qu'en 1969 grâce aux progrès des techniques de microscopie.

Les phytoplasmes sont des organismes procaryotes phytopathogènes appartenant à la classe des *Mollicutes*. Celle-ci regroupe les micro-organismes bactériens ne possédant pas de paroi cellulaire. Ce sont donc des bactéries qui sont limitées uniquement par une membrane plasmique comprenant 3 feuilletts. Ils vivent et se reproduisent dans le phloème des plantes (tissu conducteur de la sève élaborée) et dans certains insectes piqueurs-suceurs de phloème. Les phytoplasmes sont des parasites intracellulaires obligatoires, du fait de la petite taille de leur génome (un chromosome et des plasmides) et de leur faible nombre de gènes qui font qu'ils ne peuvent assurer un grand nombre de voies métaboliques indispensables pour leur survie. Les phytoplasmes constituent la plus simple forme de vie capable de se répliquer de façon autonome (Christensen *et al.* 2005)

Les phytoplasmes sont responsables de plusieurs centaines de maladies à travers le monde, comme la maladie de l'enroulement chlorotique de l'abricotier ou le stolbur des solanacées. Elles entraînent une altération puis une destruction totale des récoltes, sont préjudiciables en pays tempérés et touchent principalement les plantes cultivées telles que la vigne, les arbres fruitiers et les essences ligneuses utilisées en milieux urbain, périurbain et forestier, mais également les adventices (liseron, orties, ronces).

Ainsi, les phytoplasmoses représentent le principal facteur limitant la production d'un grand nombre de cultures. Le phytoplasme associé aux jaunisses des *Aster* (aster yellows) est par exemple responsable de pertes économiques importantes d'un grand nombre de culture (salade, carotte, céleri..) en Amérique du Nord et en Europe (Lee *et al.* 2000).

Les phytoplasmes ne sont pas cultivables, et leur classification est basée sur la variabilité des séquences génétiques de l'ARN ribosomique 16S. Ils sont regroupés au sein du genre '*Candidatus phytoplasma*', le terme '*Candidatus*' étant propre aux organismes non cultivables *in vitro*.

Les phytoplasmes à l'origine de la FD font partie du groupe 16SR-V (cf figure 2) dont tous les isolats ont été trouvés dans des plantes pérennes. Ils possèdent un génome dont la taille, très petite, avoisine les 671 +/- 14 kpb et les place parmi les plus petits génomes connus. Il

n'y a pas un seul phytoplasme responsable de la FD mais plusieurs isolats classés en 3 groupes différents:

- **Le groupe FD 1 (16SrV-C)** dont les représentants sont présents principalement dans le Sud-Ouest de la France et de façon plus isolée en Italie,
- **Le groupe FD 2 (16SrV-D)** qui est le plus répandu (83% des cas en France et 50% en Italie)
- **Le groupe FD 3 (16SrV-C)** qui est présent uniquement en Italie.

Il est possible d'observer des isolats différents sur une même parcelle de vigne.

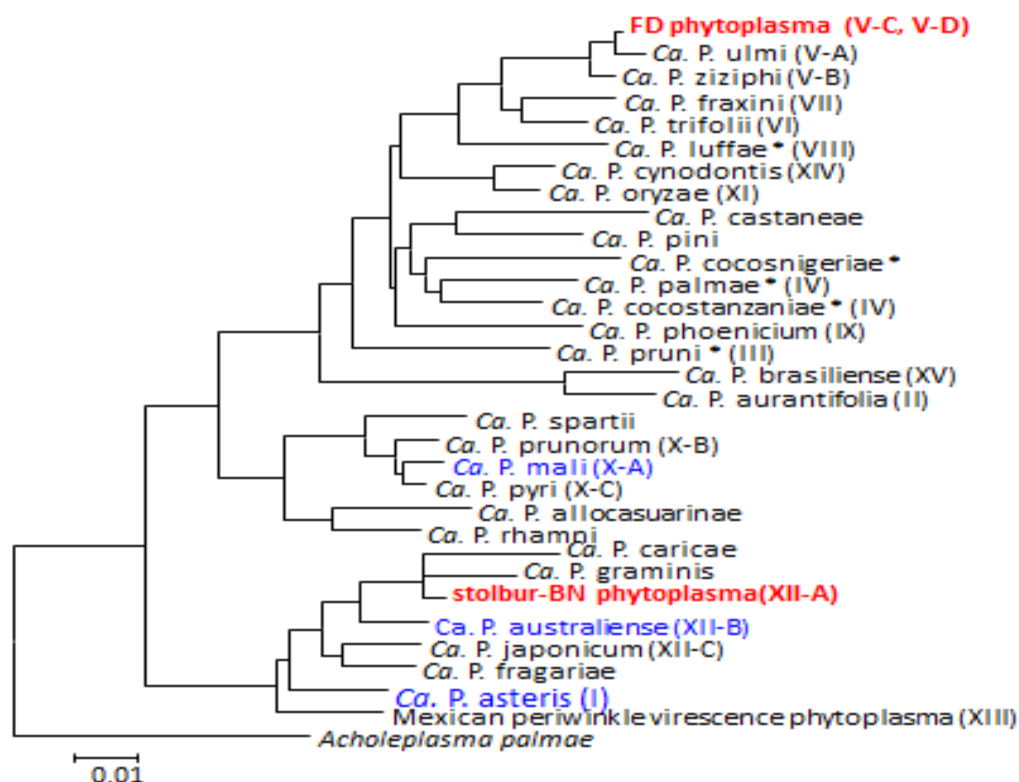


Figure 2 : Classification des phytoplasmes d'après Lee *et al.* 2000, Ann. Rev. Microbiol. **Phytoplasmes séquencés.**
Principaux phytoplasmes infectant les vignes.

Il existe deux modes de transmission du phytoplasme de la FD : par la greffe et par une cicadelle d'origine nord américaine *Scaphoideus titanus*. La Flavescence dorée se propage de manière épidémique dans les vignobles du sud de l'Europe car son insecte vecteur est inféodé à la vigne (Boudon-Padiou *et al.* 2000). *Scaphoideus titanus* est un insecte Homoptère de la famille Cicadellidae, communément appelées cicadelles. Le genre *Scaphoideus* Uhler (Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) est un des genres de cicadelles

regroupant le plus d'espèces avec plus de 150 représentants. Il est retrouvé principalement en Asie, en Afrique et Amérique du Nord d'où il a été importé en France.

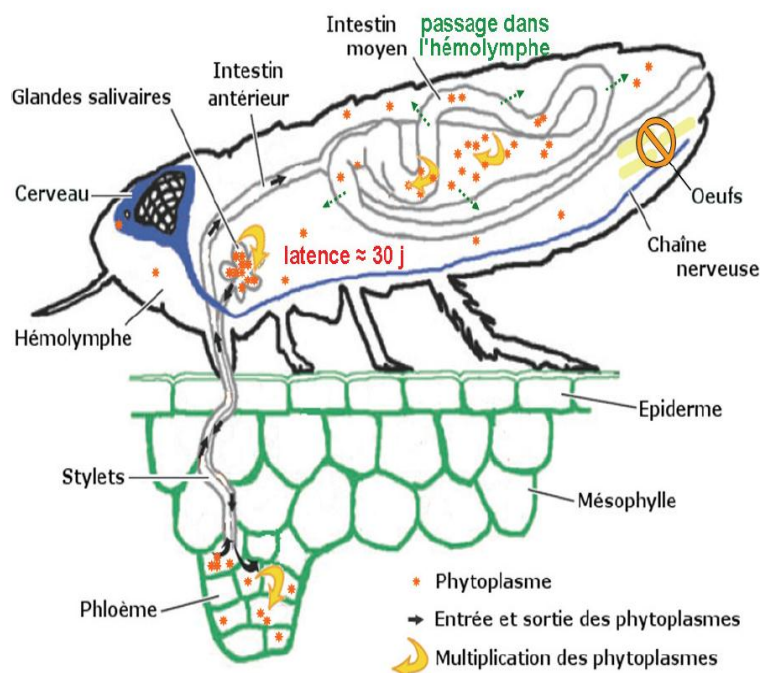


Figure 3 : Cycle du phytoplasme de la Flavescence dorée dans son vecteur. D'après Hogenhout *et al* (2008)

L'acquisition du phytoplasme de la FD (cf figure 3) se fait passivement lors de la prise alimentaire de l'insecte sur une plante infectée, et cela dès le premier stade larvaire. Une fois infecté, le vecteur le reste toute sa vie. Le phytoplasme est aspiré dans le phloème par les stylets, passe à travers la barrière intestinale, rejoint l'hémolymphe et colonise la plupart des organes. Avant que l'insecte ne devienne infectieux, une période de latence d'environ un mois est nécessaire le temps que le phytoplasme se multiplie.

En France, une stratégie de lutte obligatoire a été mise en place contre la Flavescence dorée, elle consiste en l'arrachage des plants atteints, le traitement contre l'insecte vecteur dans et autour des zones contaminées et l'utilisation de plants certifiés sains. Malgré cette réglementation instaurée depuis plus de 20 ans, la maladie progresse de manière régulière. Aujourd'hui, plus de la moitié du vignoble français est en lutte obligatoire. En Gironde, cette proportion atteint les 2/3 avec près de 90000 ha concernés.

Cette lutte a un coût économique (plus de 50euros/ha pour les traitements) et surtout environnemental. Dans le but de réduire l'impact de cette maladie, d'importants efforts ont été réalisés en Gironde. Des réseaux de prospection et de surveillance des populations d'insectes (GDONs) ainsi qu'une rationalisation du nombre de traitements et de superficies de lutte ont été mis en place. Mais il apparaît évident que des méthodes complémentaires voire alternatives de luttas doivent être développées, non seulement contre l'insecte mais également contre la bactérie qu'il véhicule.

Une des voies pour lutter contre la FD est l'obtention de vigne résistante par la voie de l'amélioration variétale. De façon générale, alors que les phytoplasmes sont responsables de

plusieurs centaines de maladies des cultures, peu de plantes résistantes ont été identifiées (Lee et al. 2000). Chez la vigne, il existe une variabilité importante de sensibilité intra-spécifique (*Vitis vinifera*) et inter-spécifique (porte-greffe PG), certains PG ne présentant aucun indice de maladie (Schvester *et al.* 1967, Moutous *et al.* 1977). Mais cette variabilité n'a pas été étudiée en conditions contrôlées et homogènes d'inoculation et n'a pas été quantifiée en terme de titre en phytoplasmes.

Mon objectif lors de ce stage était donc de déterminer une gamme de sensibilité à la Flavescence dorée au sein du genre *Vitis*, en quantifiant des phytoplasmes dans des vignes de terrain et de serre de Haut Confinement, dans le cadre d'un projet 2010/2013 financé par le CIVB (Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel végétal

1/ Vignes de terrain

➤ Prélèvements

Différents prélèvements ont été effectués en 2011 sur une parcelle de vigne à Beychac (Gironde), comportant plusieurs variétés de cépages. Trois prélèvements ont été effectués le 24 juin 2011, le 12 juillet 2011 et le 25 août 2011. Lors de chaque prélèvement, entre 160 et 180 échantillons ont été récoltés (cf tableau 1). Seuls les pétioles des feuilles ont été récupérés.

Cépage	1er prélèvement	2ème prélèvement	3ème prélèvement
Cabernet Sauvignon-S	35	31	23
Cabernet Sauvignon-M	25	22	23
Cabernet Sauvignon-A	16	6	11
Merlot-S	35	34	30
Merlot-M	31	26	26
Merlot-A	22	2	19
Sauvignon gris	5	0	5
Muscadelle	5	0	5
Sauvignon blanc	5	0	5
Sémillon	5	0	5
Malbec	1	0	1
Petit Verdot	1	0	1
Porte-greffe	12	12	12

Tableau 1 : Nombre d'échantillons de chaque cépage prélevés à Beychac

S : échantillons symptomatiques

M : échantillons prélevés du même côté que la branche symptomatique

A : échantillons prélevés du côté opposé à la branche symptomatique

➤ Préparation des échantillons

De retour au laboratoire, les pétioles sont lavés à l'eau désionisée, séchés et pesés à raison de 0.5g/échantillon, puis conservés à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

2/ Vignes de serre de Haut Confinement

Le phytoplasme de la Flavescence dorée étant un organisme de quarantaine sur vigne, les manipulations ne peuvent s'effectuer qu'en serre de Haut Confinement.

Les vignes proviennent de plants *in vitro* de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin de l'Université de Bordeaux et de l'UMR Sciences de la Vigne et Qualité du Vin de l'INRA de Colmar. Elles sont acclimatées en terreau et le phytoplasme de la Flavescence dorée leur est transmis par l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*.

Les prélèvements ont lieu 3, 5 et 10 semaines après contact avec les insectes infectieux.

Le cépage de référence Carbernet Sauvignon est présent à chaque expérience.

Le tableau 2 ci- dessous présente les différents cépages, porte-greffes ou *Vitis* sauvages testés.

N° expérience	CIVB 3	CIVB4	CIVB 5	CIVB 6
Cépage	• Cabernet-Sauvignon (CS) • Merlot (M)	• CS	• CS • Chardonnay (CH) • Pinot noir (PN)	• CS • Syrah (SY) • Grenache (GR)
Porte greffe	• Riparia Gloire de Montpellier (RGM)	• 3309 Couderc (3309) • Sélection Oppenheim 4 (SO4) • RGM	• Nemadex (NE) • 41B • 5BB	
<i>Vitis</i> sauvages				• <i>V.longii</i> • <i>V.labrusca</i>

Tableau 2: Cépages, porte-greffes et *Vitis* sauvages testés lors des différentes expériences

Pour chaque expérience, 15 plants de chaque *Vitis* sont infectés, et 3 plants sains témoins sont conservés.

Lors de chaque prélèvement, 1/3 est prélevé, soit 5 plants infectés et 1 sain par *Vitis*.

Les parties aériennes de la plante sont prélevées, lavées et séchées, puis les tiges, pétioles et nervures centrales sont conservés et pesés. Les échantillons sont conservés à -20°C.

II. Matériel animal

2/ Les insectes

Lors de la transmission, 6 ou 7 *Scaphoideus titanus* sont placés par plant de vigne durant 7 jours.

Au bout de 7 jours, on compte les *S.titanus* encore vivants, indiquant qu'ils se sont nourris et donc qu'ils ont probablement transmis le phytoplasme. Ils sont noyés dans de l'éthanol à 70%, pesés à l'aide d'une balance de précision, puis conservés à -20°C jusqu'à l'extraction de leur ADN.

III. Protocole d'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

1/ Protocole d'extraction d'ADN des échantillons végétaux de serre de HC

Après prélèvement, les échantillons végétaux de serre HC sont pesés afin d'ajuster le volume de solution de tampon nécessaire, soit 6ml pour un gramme de poids frais. L'extraction d'ADN s'effectue sous la sorbonne à cause des vapeurs toxiques de certains composés.

L'extraction d'ADN des échantillons sains est effectuée en premier pour éviter tout risque de contamination.

Les échantillons sont disposés dans des bechers où ils sont mixés dans le volume de CTAB adapté (composé de 0.016M de CTAB ; 14 M de NaCl ; 0.05M d'EDTA) et de β -mercapto-éthanol (0.2%). Après avoir laissé reposer, une partie aliquote du broyat est récupérée dans un tube de 10ml.

Les échantillons sont placés dans un bain marie à 65°C durant 30 minutes en prenant soin de les mélanger au bout de quinze minutes. Ils sont alors centrifugés (centrifugeuse SIGMA 3-18K) à 3000 rpm durant 5 minutes.

Un culot de débris végétaux est obtenu, et 1 ml de surnageant qui contient de l'ADN est récupéré dans un tube eppendorf de 2 ml.

Un mL de chloroforme+ alcool isoamylique (24/1 vol/vol) est ajouté au tube eppendorf pour extraire les protéines du surnageant. Les tubes sont agités au vortex et centrifugés à 14000 rpm durant 5 minutes.

Après centrifugation, 3 phases sont obtenues : une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN, une interphase contenant des protéines et une phase chloroforme inférieure.

0.9 mL de la phase aqueuse sont prélevés dans un tube eppendorf de 1,5 ml.

L'ADN va précipiter en ajoutant 540 μ L d'isopropanol. Les tubes sont alors placés au congélateur à -20°C durant 30 minutes minimum.

Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 14000rpm. Un culot contenant principalement de l'ADN, ainsi que des sels est obtenu. Le culot est lavé deux fois en enlevant le liquide du tube sans toucher au culot, en ajoutant 1mL d'éthanol à 70%, en les vortexant et en les centrifugeant 10 minutes à 14 000 rpm.

Une fois l'éthanol vidé, les culots sont séchés sous vide au Speed-VAC durant 5 minutes.

Ensuite 80 μ L de TE 1X (Tris 10Mm EDTA 1mM pH 8) sont ajoutés à chaque échantillon. Les tubes sont alors rangés au congélateur à -20°C avant d'être testés.

2/ Protocole d'extraction d'ADN des échantillons végétaux de terrain

A la différence des échantillons de la serre HC, le broyage des échantillons végétaux de terrain se fait à l'aide d'une broyeuse électrique (Bioreba AG). Ces échantillons sont placés

dans une pochette de broyage. Puis le protocole est le même , seul les volumes changent (cf tableau 3).

3/ Protocole d'extraction d'ADN des insectes

Le broyage des insectes s'effectue à l'aide d'un pylon dans un tube eppendorf.

Le protocole d'extraction d'ADN des insectes est quasiment le même que celui pour les échantillons végétaux, à l'exception que le chloroforme est ajouté immédiatement après l'étape de 30 minutes à 65°C, sans centrifugation préalable. Les volumes changent également, (cf tableau 3).

	Volume solution tampon	volume chloroforme	volume reprise TE
échantillons serre HC	Selon poids prélevé	1 mL	80 µl
échantillons de terrain	3 Ml	1 mL	80 µl
échantillons insectes	40 µl	1 mL	30 µl

Tableau 3 : Volume de solution nécessaire pour extraction d'ADN

Toutes les concentrations d'ADN sont ensuite calculées grâce au nanodrop (spectrophotomètre) puis les ADN sont dilués à 40 ng/µl.

IV. PCR en temps réel

1/ Principe

La PCR est une technique permettant d'amplifier l'ADN grâce à des amorces oligonucléotidiques et une polymérase thermostable. Par rapport à la PCR en point final où seule la quantité finale d'amplifiats est analysée, la PCR en temps réel permet de suivre la quantité d'ADN présente dans le milieu réactionnel à tout instant. Le niveau d'amplification est visualisé grâce à l'emploi de molécules fluorescentes se fixant sur l'ADN double brin (cf.figure 4).

Un seuil de fluorescence est établi par le programme du thermocycleur. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé « Ct » (Cycle Threshold) ou cycle seuil. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN. Afin de pouvoir déterminer la quantité d'ADN recherché présent dans le milieu réactionnel, le résultat obtenu pour chaque échantillon est comparé à une gamme d'étalonnage correspondant au couple d'amorces utilisés.

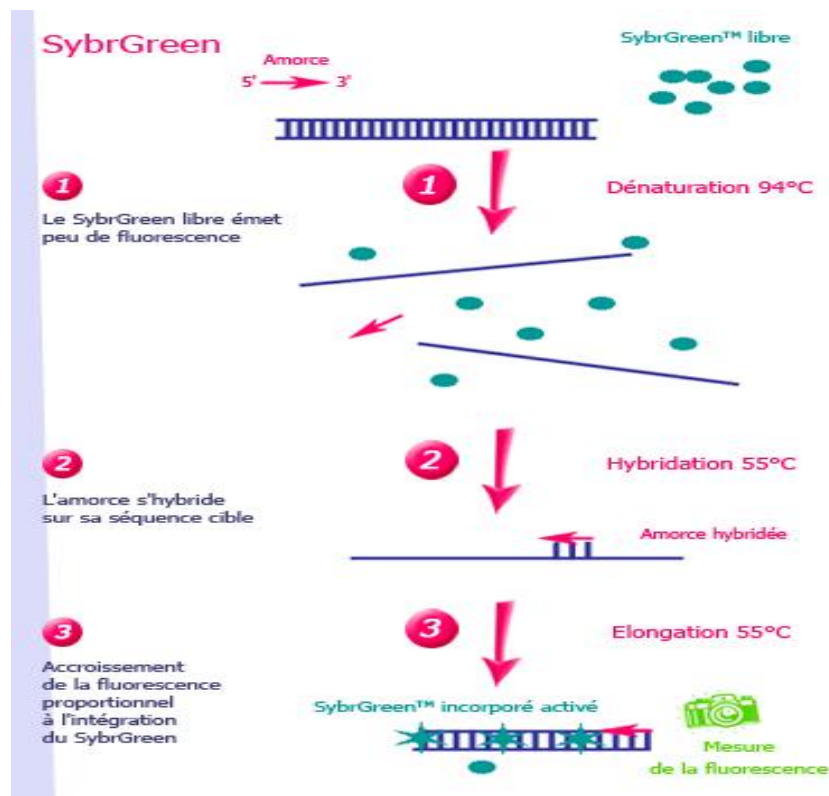


Figure 4 :Différentes étapes de la PCR SybrGreen d'après <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>

2/ Protocole de la PCR quantitative

Le gène de référence utilisé pour la détection du phytoplasme de la FD est le gène TUF. Les séquences des amorces utilisés sont les suivantes :

3Fbl	5'-TGAAGATCCAGTAGGTATTTAGAC-3'
3Rl	5'-TTTTAGTTTCTTTAATACCTATGATTTC-3'

Les amplifications sont réalisées à l'aide du kit SYBR Green Roche et sont effectuées dans des plaques de 96 puits dans un volume final de 20 µL.

Pour chaque plaque, 1 mL de master mix 2x Roche est mélangé à 350µL d'eau, 50µL de l'amorce oligonucléotique 3FBL à 10µM, et à 100µL de l'amorce oligonucléotique 3RL à 10µM. Ce mélange constitue le Mix.

15µL de Mix sont répartis dans chaque puits de la plaque. Chaque puits reçoit ensuite 5µL d'échantillons (eau pour les témoins de Mix, ADN de vigne saine pour les témoins négatifs). Il doit y avoir 200ng d'ADN à tester par puits et les dépôts sont faits en double.

Cinq µL de chaque dilution de plasmide (gamme) sont déposés dans les puits. Cette gamme s'étend de 10 à 100 000 000 de plasmides (de 10¹ à 10⁸). Les échantillons analysés ont

généralement un titre en phytoplasme compris dans cette gamme. Un film plastique collant est placé sur la plaque afin d'éviter toute fuite et toute évaporation.

La plaque est placée dans une centrifugeuse à 2000g pendant quelques secondes pour faire tomber les gouttes se trouvant sur les bords des puits, au fond de ces derniers.

La plaque ainsi obtenue est placée dans le thermocycleur Roche Lightcycler 480. Le programme utilisé comprend une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes, une étape d'amplification de 45 cycles composés de 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C, 30 secondes à 66°C, puis une étape de dénaturation composée de 10 secondes à 95°C, et une étape de « melting » de 66°C à 95°C par bond de 0.5 °C.

On retire la plaque du thermocycleur lorsque la PCR est terminée (elle dure environ 1h45) et on la jette dans une poubelle prévue pour les déchets SYBRgreen.

V. Analyses statistiques

Après chaque plaque testée, les données du logiciel Lightcycler de la machine sont récupérées. Ils nous renseignent sur les concentrations en phytoplasmes par 200ng d'ADN de chaque échantillon. Ensuite, les moyennes des deux replicats sont faites grâce à Excel, puis le logiciel statistique Rcommander est utilisé afin d'effectuer les tests de Wilcoxon.

RESULTATS

Tous les résultats obtenus grâce à la PCR sont traités en taux de phytoplasmes par 200ng d'ADN, et les mêmes résultats ont été analysés en terme de phytoplasmes par gramme de poids frais de la plante. Après comparaison, les résultats se sont avérés similaires.

I. Quantification du phytoplasme de la flavescence dorée dans les vignes de terrain

Les cépages qui ont été prélevés à Beychac lors des trois prélèvements en 2011 sont soit du Cabernet-Sauvignon, soit du Merlot.

- Pieds symptomatiques

Concernant le premier prélèvement effectué, pour les Cabernet Sauvignon, la concentration moyenne en phytoplasmes par 200 ng d'ADN est de 2.5^{E+4} , soit 5 fois plus élevée que celle des Merlot qui est de 5.0^{E+3} .

Les tests statistiques confirment que la différence en taux de phytoplasmes est significative entre les deux cépages, p-value= 3.2^{E-7}

La concentration en phytoplasmes du CS de l'échantillon le plus faible est de 3.0^{E+3} et celle du Merlot la plus élevée atteint 2.1^{E+4} . Les concentrations sont donc chevauchantes.

Concernant le deuxième prélèvement des CS au mois de juillet, la concentration moyenne est de 1^{E+4} phytoplasmes par 200ng d'ADN est celle des Merlots de 5.9^{E+3} phytoplasmes, soit 17 fois inférieure à celle du CS, les tests statistiques confirment que cette différence est significative, p-value= 5.6^{E-12}

Les concentrations des CS les plus faibles et des Merlots les plus élevées ne se chevauchent quasiment pas.

Enfin, le troisième prélèvement effectué au mois d'août, donne pour les CS une concentration moyenne de 1.2^{E+5} phytoplasmes par 200 ng d'ADN alors qu'elle n'est que 5.7^{E+3} pour les Merlots. Le taux de phytoplasmes est donc 22 fois plus élevé pour les CS que pour les Merlots, et les concentrations ne se chevauchent plus. Les tests statistiques démontrent encore une fois que la différence en taux de phytoplasme par 200 ng d'ADN est significative, p-value= 4.8^{E-9} .

Les résultats des trois prélèvements des pieds symptomatiques de Beychac, effectués au mois de juin, juillet et août 2011, montrent que les taux de phytoplasmes entre les CS et les Merlots sont significativement différents pour les trois prélèvements. Le taux de phytoplasmes des Merlots est peu variable au cours du temps, alors que celui des CS augmente et s'étend de plus en plus au cours du temps.(cf figure 5)

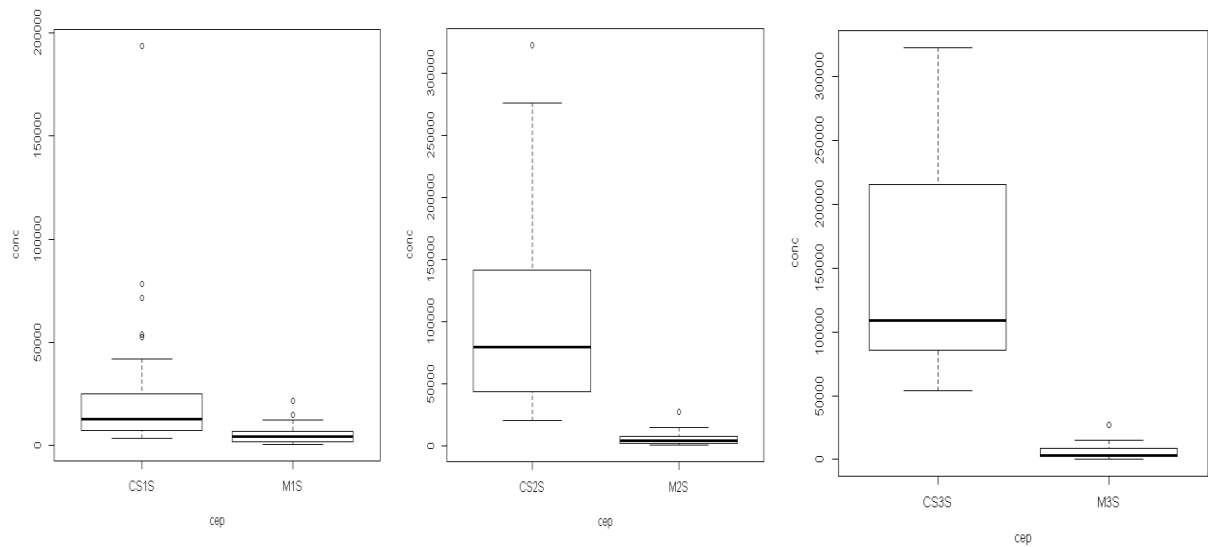


Figure 5 : Boîtes de dispersions montrant la médiane et les quartiles des concentrations en phytoplasmes des CS et des Merlots symptomatiques lors des 3 prélèvements (de gauche à droite : 1^{er} prélèvement, 2^{ème} prélèvement, 3^{ème} prélèvement).

Concernant les échantillons de CS et de M prélevés du même côté et du côté opposé à la branche symptomatique, les résultats ont montré que sur les branches non symptomatiques d'un cep symptomatique, le phytoplasme n'est pas toujours détectable. Ceci indique donc une répartition non homogène du phytoplasme dans la plante. Par ailleurs, plus on s'éloigne de la branche avec symptôme, moins on a de chance de détecter le phytoplasme.

II. Quantification du phytoplasme de la flavescence dorée dans les vignes de serre haut confinement

1/ Manipulation n°3 (CIVB 3)

Lors de l'expérience « CIVB3 » (manipulation n°3) plusieurs espèces de *Vitis* ont été testées : Carbernet-Sauvignon, qui est notre plante de référence, Merlots, Riparia Gloire de Montpellier, des boutures de Cabernet- Sauvignon, ainsi que des boutures de RGM.

Toutes les plantes prélevées ne se sont pas toutes révélées positives pour la présence du phytoplasme de la FD. En effet, lors du deuxième prélèvement par exemple, 5 CS se sont révélés positifs sur les 5 récoltés alors qu'un seul des RGM l'a été. Les plantes négatives pour la présence du phytoplasme de la FD n'ont pas été prises en compte lors des calculs des moyennes (cf figure 6).

Le taux de phytoplasmes augmente entre les deux premiers prélèvements, mais cela n'a pas été observé entre le 2^{ème} et le 3^{ème} prélèvement.

Concernant les Cabernets Sauvignons et les Merlots, une différence de taux en phytoplasmes est toujours présente.

En effet, lors du premier prélèvement :

CS : 906 phytoplasmes/200ng d'ADN

M : 37 phytoplasmes/200ng d'ADN Soit 25 fois plus de phytoplasmes pour les CS.

Lors du deuxième prélèvement :

CS : 14850 phytoplasmes/200ng d'ADN

M : 72 phytoplasmes/200ng d'ADN Soit 205 fois plus de phytoplasmes pour les CS

Lors du troisième prélèvement :

CS :1420 phytoplasmes/200ng d'ADN

M :14 phytoplasmes/200ng d'ADN Soit 100 fois plus de phytoplasmes pour les CS

Ces résultats confirment la différence du taux en phytoplasmes entre les deux cépages observée au terrain.

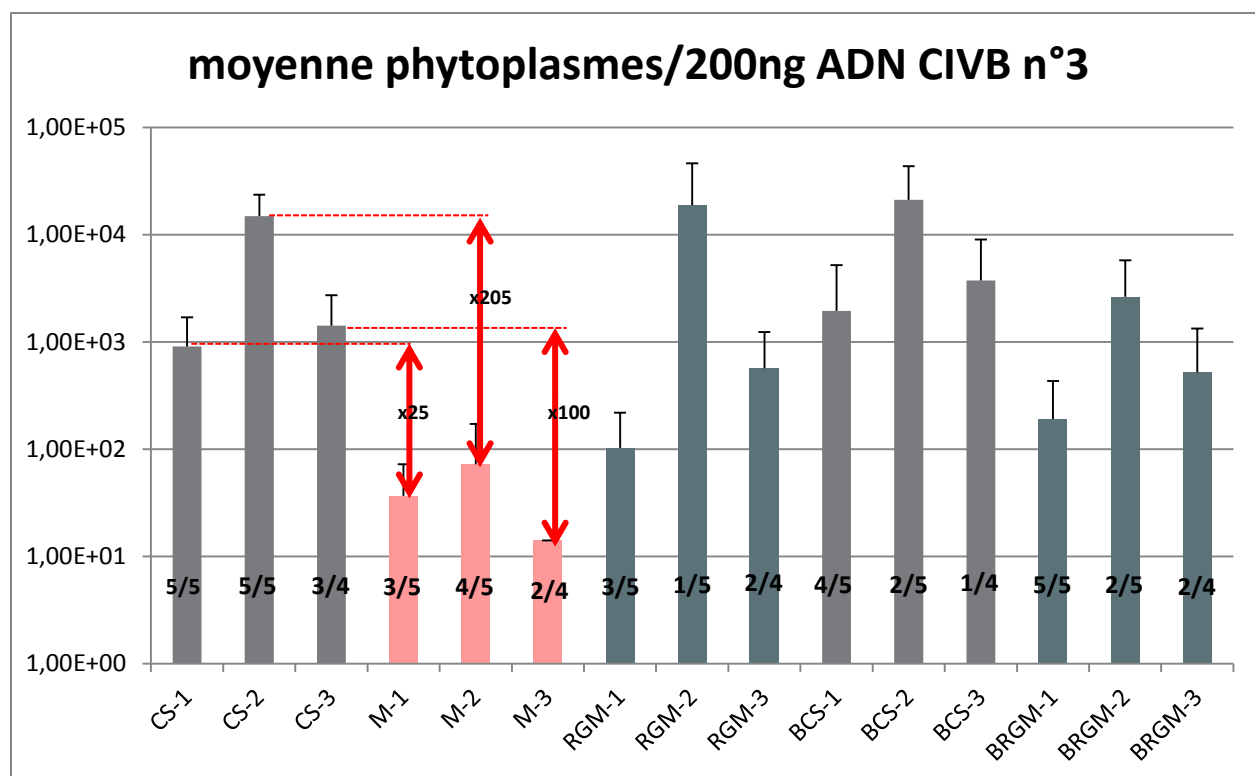


Figure 6 : Histogramme représentant les moyennes du taux en phytoplasmes par 200ng d'ADN des différentes plantes testées lors des trois prélèvements du CIVB3. CS=Cabernet Sauvignon, M=Merlot, RGM=Riparia Gloire de Montpellier, BCS et BRGM= boutures de CS et de RGM. 1 – 2 – 3 =numero de prélèvement. Fractions (5/5, 2/5...) : nombre de plantes positives sur nombre de plantes prélevées.

2/ Manipulation n°4 (CIVB 4)

Lors de la quatrième manipulation, les plantes testées sont les Cabernets Sauvignon, les 3309, les SO4 et les RGM.

Force est de constater que les taux de phytoplasmes dans chaque plante augmentent au cours du temps, et qu'ils sont significativement différents pour les 3 prélèvements chez 3309, SO4 et RGM, des taux observés pour le CS (cf figure 7).

En effet, dès le premier prélèvement, les 3309 ont un taux de phytoplasmes 17 fois moins élevé, les SO4 27 fois et les RGM 115 fois moins élevé que le taux de phytoplasmes des CS.

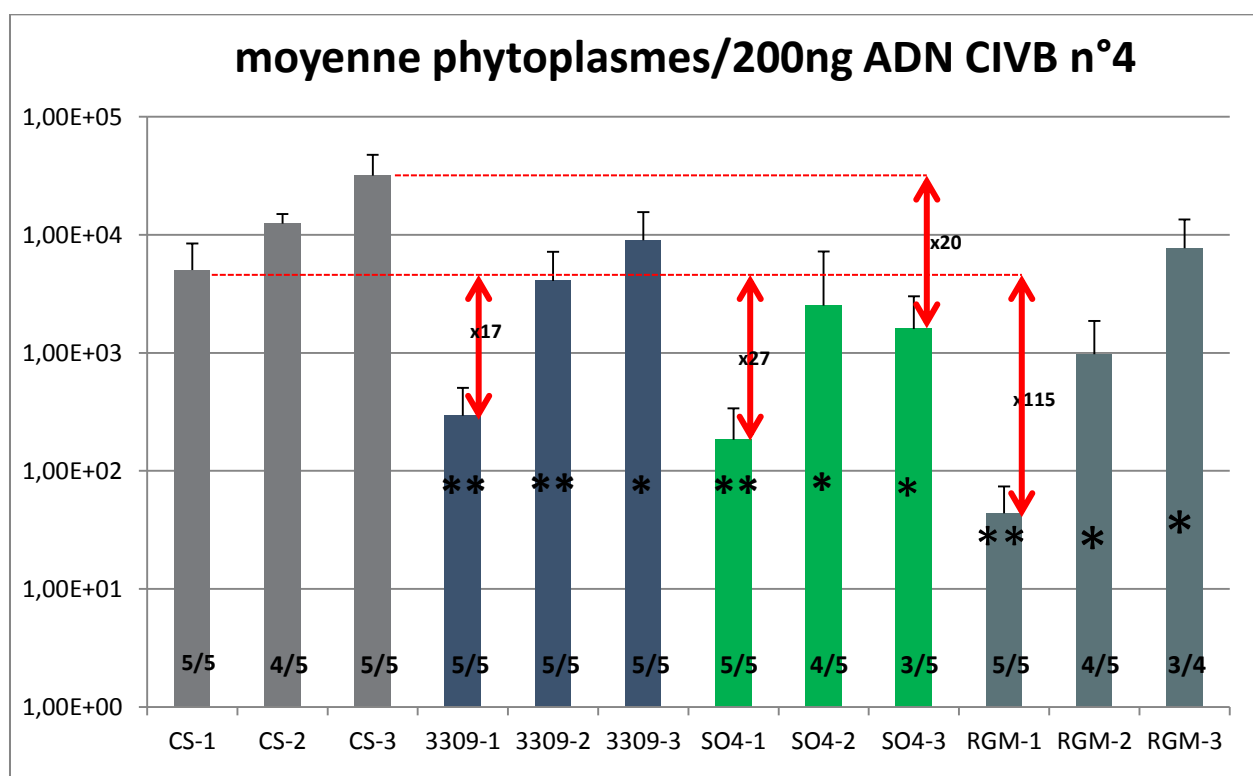


Figure 7: Histogramme représentant les moyennes du taux en phytoplasmes par 200ng d'ADN des différentes plantes testées lors des trois prélèvements du CIVB 4. CS=Cabernet Sauvignon, RGM=Riparia Gloire de Montpellier. 1 – 2 – 3 =numéro de prélèvement. * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$. fractions (2/5, 5/5...) : nombre de plantes positives sur nombre de plantes testées

3/ Manipulation n°5 (CIVB 5)

Les plantes étudiées pour cette manipulation sont le Cabernet-Sauvignon, le 41B, le 5BB, le Chardonnay, et le Pinot Noir.

Lors des différents prélèvements, toutes les plantes ne se sont pas révélées positives pour la présence du phytoplasme.

Concernant le premier prélèvement, la concentration en phytoplasmes des CS atteint 5.84^{E+3} et augmente à 1.76^{E+4} au deuxième prélèvement pour finir à 3.68^{E+4} phytoplasmes/200ng d'ADN.

Par ailleurs, pour chaque cépage la quantité de phytoplasmes augmente au cours des prélèvements à l'exception du 5BB.

Le rapport entre la concentration en phytoplasmes des CS et celle des autres cépages peut atteindre 702 (cf figure 8). Par ailleurs, le cépage Nemadex ne présente aucune plante positive pour la présence du phytoplasme de la FD au cours des trois prélèvements.

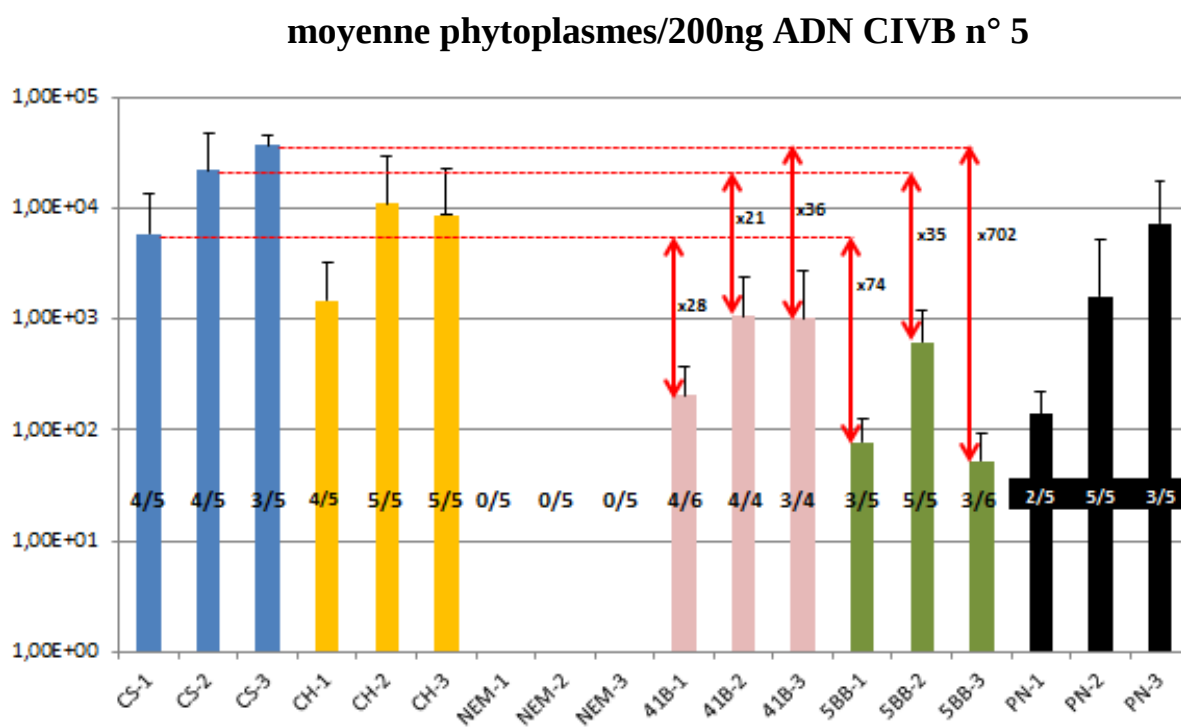


Figure 8: Moyenne du taux en phytoplasmes par 200ng d'ADN des différentes plantes testées lors des trois prélèvements du CIVB 4. CS=Cabernet Sauvignon, CH=Chardonnay, NEM=Nemadex, PN=Pinot Noir. 1 – 2 – 3 =numéro de prélèvement. Fractions (2/5, 5/5...) : nombre de plantes positives sur nombre de plantes testées

4/ Etablissement d'une gamme de sensibilité

L'étude des coefficients multiplicateurs a permis d'établir un classement en trois catégories des *Vitis* testés. Ces coefficients ont été calculés par rapport au CS pour les trois expériences étudiées, et correspondent au taux en phytoplasmes du CS / taux en phytoplasmes du *Vitis* testé.

Les trois catégories sont :

« sensibles », « moyennement sensibles », et « peu sensibles » au phytoplasme de la FD.

En analysant les trois graphiques (cf figure 9, figure 10 et figure 11) on s'aperçoit que, mis à part au premier prélèvement, les Merlots se trouvent dans la catégorie des « peu sensibles » avec les 5BB. Les PN, SO4 et 41B peuvent être classés dans la catégorie « moyennement sensibles ».

Les Chardonnay et les 3309 sont classés dans la catégorie des « sensibles ».

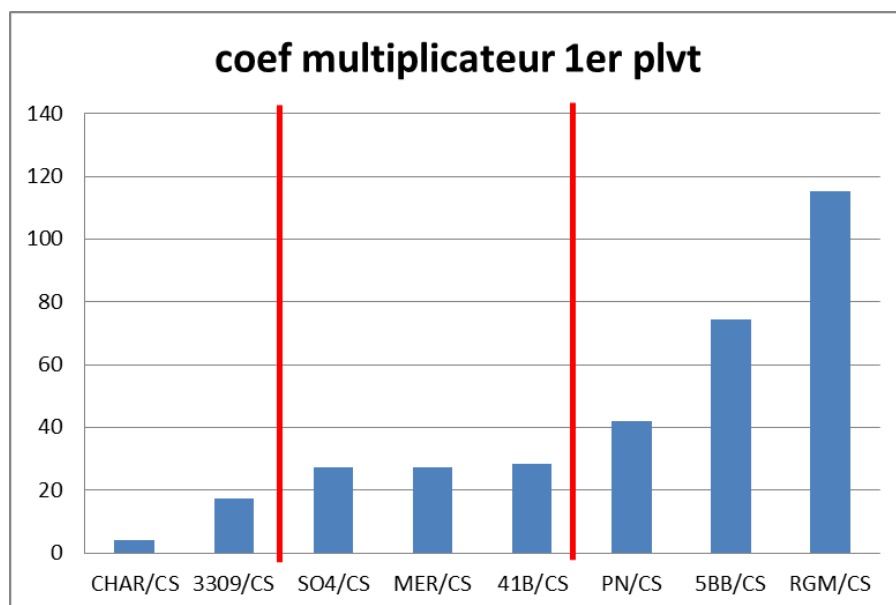


Figure 9: Coefficients multiplicateur des différentes espèces par rapport au CS lors du premier prélèvement

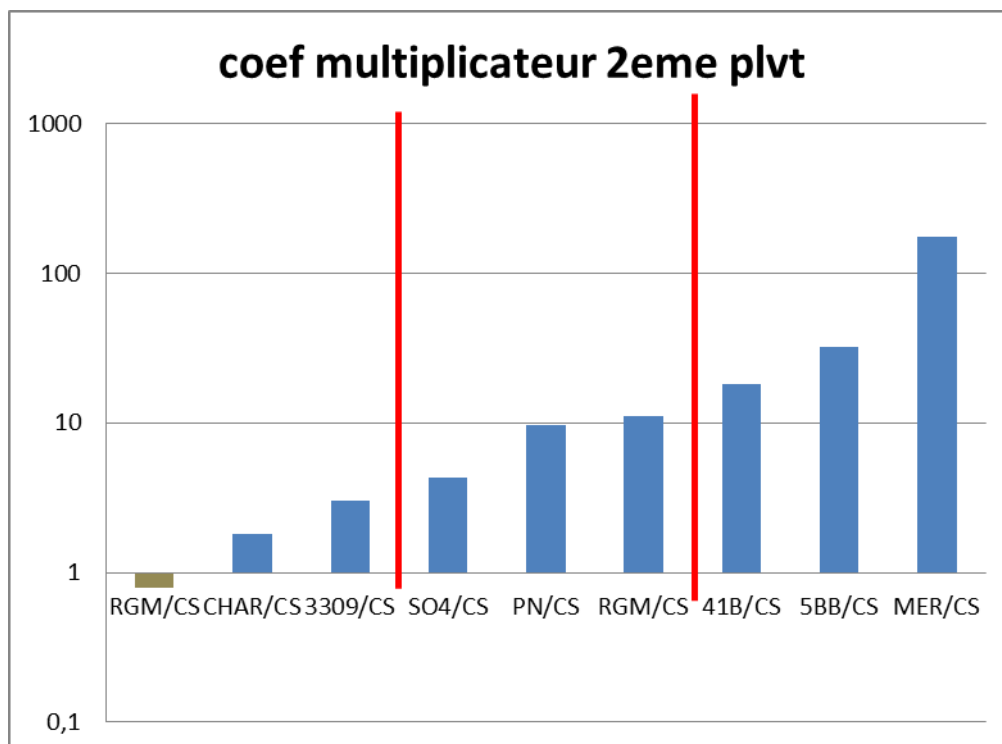


Figure 10 : Coefficients multiplicateur des différentes espèces par rapport au CS lors du deuxième prélèvement

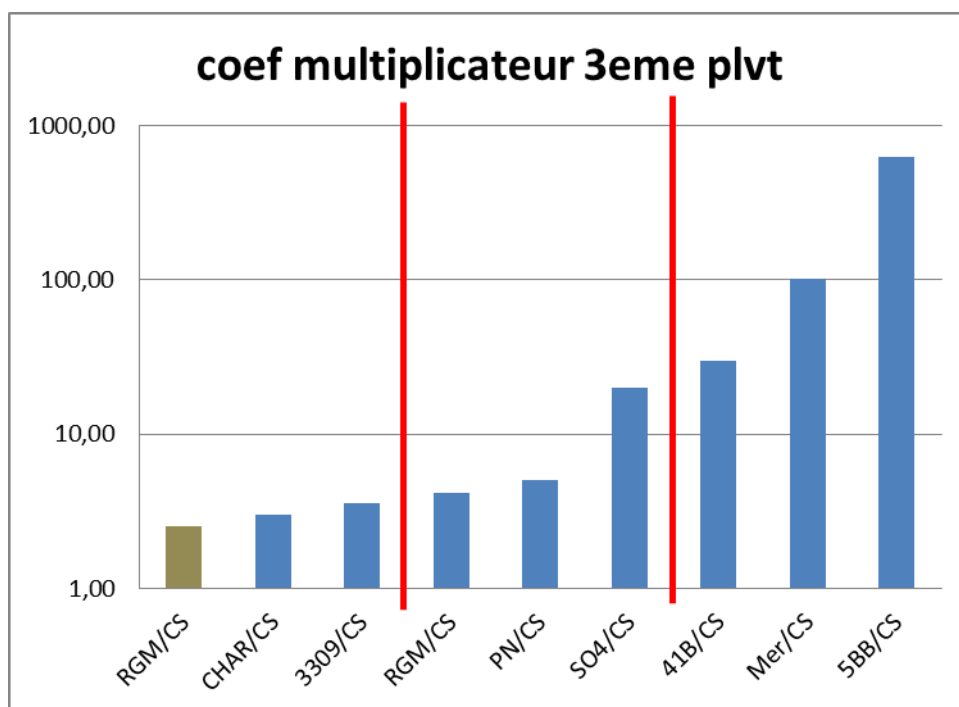


Figure 11: Coefficients multiplicateur des différentes espèces par rapport au CS lors du troisième prélèvement

CONCLUSION-DISCUSSION

La Flavescence dorée est une maladie de quarantaine sur vigne. Aujourd'hui, plus de la moitié du vignoble français est en lutte obligatoire. En Gironde, cette proportion atteint les 2/3 avec près de 90000 ha concernés. Le projet 2010/2013 financé par le CIVB (Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux) a pour objectif de trouver d'autres alternatives afin combattre cette maladie. J'avais donc pour objectif lors de mon stage, d'établir une gamme de sensibilité à la FD au sein du genre *Vitis*, en testant d'une part des échantillons provenant du terrain, et d'autre part des échantillons provenant de la Serre de Haut Confinement.

Les expériences effectuées en Serre de Haut Confinement montrent que les Cabernets-Sauvignons présentent un taux de phytoplasmes plus élevé que les Merlots. En effet, le phytoplasme de la FD semble moins se multiplier dans le Merlot que dans le CS. Cette observation a été confirmée par les tests sur des échantillons de terrains prélevés sur des parcelles à encépagement mixte CS-Merlot.

Ceci est en accord avec les descriptions effectuées antérieurement, qui indiquaient que les parcelles de merlot montraient moins de plants symptomatiques qu'une parcelle de CS.

Par ailleurs, les CS sont hétérogènes en terme de multiplication des phytoplasmes. En effet, les échantillons prélevés à Beychac ont montré que la concentration en phytoplasmes qui augmentent au cours du temps s'étend de plus en plus alors que celle des Merlots reste plus homogène avec une moins grande amplitude.

Cette différence de multiplication en phytoplasme peut s'expliquer par une qualité intrinsèque de la plante, mais également par le comportement de l'insecte vecteur : les insectes ne préfèrent-ils pas se nourrir sur les CS plutôt que sur les Merlots ? Cela pourrait en effet expliquer le fait qu'ils transmettent plus de phytoplasmes aux CS qu'aux Merlots. Pour vérifier cette hypothèse, il serait judicieux d'aller sur le terrain afin d'observer la préférence des larves en les comptant sur les deux cépages.

Cette différence en taux de phytoplasmes entre les CS et les Merlots pourrait également s'expliquer par le fait que le Merlot ne diffuse pas de manière égale le phytoplasme dans toutes ses parties aériennes. Une des idées afin de vérifier cela, serait d'encager les insectes sur une seule feuille et tester les différentes parties aériennes de la plante pour voir où se situent les phytoplasmes, et comparer les situations entre CS et M.

Concernant le Nemadex, aucun phytoplasme n'a été détecté lors des différents prélèvements. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce fait : un défaut de multiplication du phytoplasme dans la plante ou une absence de piqûre de l'insecte. Dans un cas, la plante serait résistante à la piqure de l'insecte, dans l'autre elle serait résistante au phytoplasme. Ces hypothèses doivent donc être vérifiées. Pour cela, il serait intéressant de greffer un Nemadex sur un Cabernet Sauvignon et inversement, puis encager des insectes infectieux sur une seule feuille, de CS ou de Nemadex, et tester la diffusion du phytoplasme dans le greffon.

Par ailleurs, il a été constaté que les CS ont plus un taux de phytoplasmes similaire quelle que soit l'expérience, et que la majorité des cépages le multiplient de la même manière. Les PG quant à eux ne montrent pas de symptômes mais multiplient le phytoplasme. Ces expériences ont permis de montrer que les différents porte greffes, et cépages testés ont différents niveaux de sensibilité à la Flavescence dorée et d'établir ainsi une gamme de sensibilité :

- Les plus sensibles : CS, Chardonnay
- Les moyennement sensibles : Pinot Noir, SO4, 41B
- Les moins sensibles : Merlot, 5BB et peut-être le Nemadex.

La classification établie par rapport aux résultats obtenus viennent confirmer les classements qui avaient déjà été effectués auparavant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M. & Schulz, A. (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in plants science*. **10**: 526-535.
- Lee, I.M., Davis, R.E. & Gundersen-Rindal, D.E (2000), Phytoplasma : Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. **54**: 221-255
- Boudon-Padieu, E.(2000) Cicadelle vectrice de la flavescence dorée, *Scaphoideus Titanus*, Ball 1932. *Ravageurs de la vigne* (ed. Féret), pp. 110-120.
- Guillaume Arnaud, Sylvie Malembic-Maher, Pascal Salar, Patrick Bonnet, Michael Maixner, Carmine Marcone, Elisabeth Boudon-Padieu, Xavier Foissac (2007) Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Doree Phytoplasma Strain Clusters and Groups 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. **73**: 4001–4010.
- Malembic-Maher, Constable, F. E, Cimerman, A., Arnaud, Foissac (2008). A chromosome map of the Flavescence doree phytoplasma. *Microbiology* 154 : 1454-1463.

ANNEXES

Annexe 1 : Photographies de plants in vitro de CS en Serre de Haut Confinement



Annexe 2: Photographies de CS avec symptômes 5 semaines après infection des *Scaphoideus Titanus*



Annexe 3 : *Scaphoideus Titanus* sur les plantes lors de l'infection durant 7 jours



RESUME

La Flavescence dorée (FD) est une maladie à phytoplasmes de la vigne qui progresse dans les vignobles du sud de l'Europe et tout particulièrement dans le sud-ouest de la France. Elle se transmet de vigne en vigne par le biais du greffage de plants infectés et par une cicadelle vectrice *Scaphoideus titanus*. La lutte obligatoire contre cette maladie de quarantaine, principalement basée sur l'arrachage et les traitements insecticides a un coût économique, humain et environnemental important. Comme il existe une forte variabilité intra et inter-spécifique de sensibilité au phytoplasme de la FD chez la vigne, l'amélioration variétale est une méthode à explorer pour mieux lutter contre cette maladie.

Mon stage de trois mois effectué au sein de l'équipe Mollicutes, de l'UMR 1332 Biologie et Pathologie du Fruit de l'INRA s'est inscrit dans le projet 2010/2013 financé par le CIVB (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux). Mon objectif était de déterminer une gamme de sensibilité au sein du genre *Vitis* et la recherche de sources de résistance chez les *Vitis* sauvages.

Flavescence dorée- phytoplasme- *Scaphoideus titanus*- Cicadelles- *Vitis*