

## FLAVESCENCE DORÉE DE LA VIGNE : CONNAISSANCES ET NOUVELLES AVANCÉES EN ÉPIDÉMIOLOGIE, ÉTIOLOGIE ET DIAGNOSTIC

Elisabeth BOUDON-PADIEU,  
Biologie et écologie des phytoplasmes, UMR 1088 BBCE-IPM, INRA- Dijon  
BP 86510, 21065 – DIJON Cedex, France  
eboudonpadieu@gmail.com

### HISTORIQUE

La Flavescence dorée (FD) fut la première jaunisse de la vigne (JV) décrite au monde. Elle apparut en Gascogne en 1955. D'abord attribuée à un désordre physiologique, la preuve de son caractère infectieux fut établie lorsque son vecteur, la cicadelle *Scaphoideus titanus* Ball fut identifiée (71). On a longtemps pensé que l'agent infectieux était un virus, jusqu'à ce que la découverte des "MLO" (mycoplasma-like organisms, alias phytoplasmes) chez les plantes oriente la recherche vers ces nouveaux agents pathogènes qui furent observés dans le corps de cicadelles vectrices de la FD et dans les vignes malades inoculées par ces dernières (19). Pendant les décennies suivantes, des maladies ressemblant à la FD furent décrites dans d'autres pays et dénommées FD ou "de type FD" (39, 67). Le comité directeur de l'ICVG (International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine) recommanda en 1992 le terme générique de "Grapevine yellows" (GY) ou "Jaunisses de la vigne" (JV) pour ces maladies, en réservant le nom de FD à la seule maladie associée à l'activité de la cicadelle *Scaphoideus titanus* (16). Durant les années 90, l'étude des JV décrites dans de nombreux pays du monde, et l'identification par les méthodes de biologie moléculaire, des phytoplasmes associés, aidèrent à caractériser les agents étiologiques de chacune d'elles et à établir de façon certaine la distribution géographique de la FD *sensu stricto*.

Au cours des années 60, et lors de sa première manifestation, la FD détruisit une partie des vignobles de la Chalosse et de l'Armagnac et pénétra en Corse (18, 20). Une deuxième épidémie se déclara au début des années 80 à l'Ouest du Languedoc et n'a depuis pas cessé sa progression dans toutes les directions. C'est une maladie de quarantaine dont la lutte obligatoire est organisée par le Service de la Protection des Végétaux. Cependant, la situation des vignobles derrière le front de progression est très contrastée. Bien que l'assainissement des parcelles atteintes puisse être réalisé progressivement dans les zones de lutte, des foyers ponctuels peuvent malgré tout se déclarer au sein de vignobles stabilisés.

En 1964, Vidano (76) observa la présence de *S. titanus* en Italie du Nord. En 1973, une maladie de type FD fut décrite en Oltrepò Pavese – Lombardie (7). La cicadelle *S. titanus* fut observée dans cette région en 1975 (64). Une controverse sur la présence effective de la FD dans les régions italiennes, découla de la présence simultanée, dans les vignobles italiens, du Bois noir (non transmis par *S. titanus*) alors que le diagnostic moléculaire et la caractérisation des phytoplasmes présents dans les tissus des vignes malades, n'étaient pas encore possibles (65). Au début des années 90, la progression rapide de la maladie suggéra fortement la présence, dans plusieurs régions italiennes, de FD *sensu stricto*, qui fut alors confirmée par les méthodes sérologiques et moléculaires qui venaient d'être élaborées (9, 10, 17, 32, 33, 65)

En Espagne, la FD fut identifiée pour la première fois en 1996 au Nord-Est de la Catalogne (4). Les premières parcelles infectées furent rapidement arrachées. Bien qu'elle ait été détectée à nouveau en 1999 (Laviña, communication personnelle), l'arrachage immédiat des souches malades semble avoir arrêté pour l'instant la diffusion de la maladie.

La FD a été déclarée organisme de quarantaine dans la Communauté européenne (Directive CE n°77/1993 modifiée 92/103). La déclaration de la maladie et le détail des mesures de lutte ont fait l'objet de décrets ministériels en France (17 avril 1987 et 1er avril 1994) et en Italie (31 mai 2000).

## DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DU VECTEUR ET DE LA MALADIE

### **Origine et distribution de *Scaphoideus titanus***

L'espèce *Scaphoideus titanus* Ball, 1932, est une Deltocephalidae de la famille des Cicadellidae. Au sein du genre nord-américain *Scaphoideus* Uhler, 1889, elle est la seule espèce introduite en Europe. L'espèce peut être trouvée en Amérique du Nord dans les états de New York, Virginia, Illinois, South Dakota, Ontario et dans le sud du Québec (77). Elle a été identifiée pour la première fois en Europe en 1958 dans un vignoble de Gironde (11). Depuis, elle s'est répandue fort loin vers l'Est et le Nord.

En France, elle a été observée dans les années 70 dans des vignobles du sud de l'Aquitaine, de Midi-Pyrénées, du Languedoc et de Corse (15, 20); au cours des années 80 et 90, elle s'est étendue vers le nord aux vignobles bordelais, charentais, du Poitou, de la vallée du Rhône jusqu'au Sud-Beaujolais, la Savoie (36) et la Bourgogne (non publié). Dans cette dernière région, elle s'est complètement installée également au Nord, dans un vignoble de l'Yonne, depuis 1998. Seuls, actuellement, une partie des vignobles de Loire et les vignobles alsacien et champenois, sont totalement indemnes de sa présence.

*S. titanus* s'est installée dans d'autres pays d'Europe : au Nord-est de l'Espagne (45) en Catalogne dans les vignobles d'une zone littorale allant de Gérone au sud de la Tarragone (Laviña, communication personnelle) au Nord du Portugal (69), en Suisse romande et au Tessin (3, 27); plus à l'est, il a colonisé le Nord de l'Italie en Piémont, Ligurie, Lombardie, Vénétie et Frioul (8, 64, 76), ainsi que la Slovénie et la Croatie (38). On observe ainsi que l'espèce s'est installée d'ouest en est dans une zone climatique ayant des hivers froids et des étés longs, entre la latitude Nord de la Loire, la Suisse, l'Italie du Nord et la Croatie (environ 47°N) et celle de la Corse et du Nord Portugal (environ 42°N). On peut faire l'hypothèse en observant son extension vers le nord des années 70 aux années 90, que son cycle biologique s'est adapté à des étés plus courts. Au contraire, des hivers doux défavorables à la régularité des éclosions, pourraient limiter la colonisation. La longue période d'éclosions observée en Corse a été attribuée aux hivers doux (20).

### **Distribution de la Flavescence dorée**

La FD est largement présente en France dans toutes les régions viticoles du Sud et du Sud-Ouest (32). Plus de 300 000 ha de vignobles étaient placés en lutte obligatoire en 2000 (70). Les foyers les plus récents se sont déclarés en Savoie en 2000 et au Nord de la Provence en 2001. En Italie du Nord, la FD a été identifiée au Piémont, en Ligurie, en Lombardie et en Frioul et Vénétie (8, 9, 10, 59, 65).

Une première cause de cette progression implacable peut être l'évaluation inexacte de la présence réelle de la maladie et l'existence de réservoirs non identifiés du phytoplasme de la FD; une seconde cause peut être l'entrée sournoise de l'agent pathogène par du matériel de plantation infecté qui serait mis en place dans des vignobles déjà colonisés par la cicadelle vectrice (22). Dans les deux cas, de nombreux vignobles abritant la cicadelle *S. titanus* sont aujourd'hui sous la menace de l'arrivée de la FD.

## SYMPTOMES, ÉTIOLOGIE ET BIOLOGIE DE LA FLAVESCENCE DORÉE

### Symptômes et étiologie

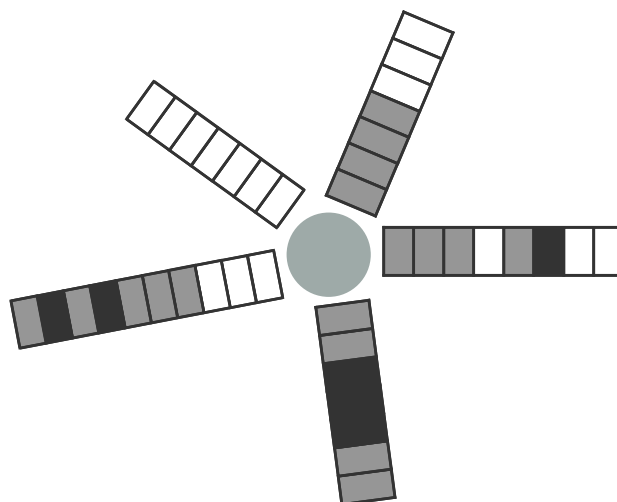
La FD et les autres JV produisent des symptômes semblables sur *V. vinifera*. Ils évoquent une mauvaise circulation de la sève et le transport défectueux des produits de la photosynthèse depuis les feuilles vers les rameaux : enroulement de feuilles, anomalies de coloration des limbes et des nervures, absence partielle ou totale de stockage des réserves (aoûtement) manifestée par des sarments flexueux et le dépérissement d'une partie ou de la totalité de la souche.

Les JV ont été associées à plusieurs phytoplasmes différents dans plusieurs pays. Parmi eux, la FD représente un cas où l'étiologie a été entièrement établie. Bien que les phytoplasmes ne soient pas cultivables et que par conséquent le postulat de Koch n'ait pu être satisfait au sens littéral, le phytoplasme de la FD a été observé et détecté de façon spécifique aussi bien dans les vecteurs naturel et expérimental (13, 19, 34, 50), et dans les vignes malades naturellement infectées (30, 33, 52) et inoculées expérimentalement à l'aide de vecteurs qui ont développé des symptômes semblables à ceux observés au vignoble (24, 60).

### Interactions plante-phytoplasme

Les phytoplasmes sont des bactéries habitant exclusivement le phloème des plantes. Il a été montré sur des plantes inoculées expérimentalement (la fève *Vicia faba* ou la pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus*, qu'après l'inoculation par un insecte vecteur infectieux ou par la greffe, les phytoplasmes descendent d'abord vers les racinelles, se multiplient et remontent en envahissant le collet et l'ensemble du système racinaire; puis les phytoplasmes remontent vers les rameaux secondaires en développement et se multiplient activement dans les nervures des jeunes feuilles (44, 51). Le phytoplasme de la FD est présent dans les tissus de la vigne infectée selon une répartition irrégulière et à de faibles concentrations (28, 60). Les désordres cytologiques observés en microscopie électronique peuvent concerner la totalité d'un faisceau libérien, contenant des tubes criblés nécrotiques et compactés. Toutefois, ces désordres n'affectent souvent que quelques-uns des faisceaux du même rameau ou de la même nervure; ces réactions de la plante semblent aussi affecter les cellules de phytoplasmes qui semblent coagulées ou déformées (29, 60). D'autres tubes libériens qui ne contiennent que quelques cellules de phytoplasmes, conservent une apparence normale. De ce fait, des sarments normalement aoûtés peuvent contenir des phytoplasmes "latents" infectieux. Le prélèvement de tels sarments sur des vignes-mères contribuera à la diffusion de la FD à distance par des boutures infectées (18, 22).

Toutes les variétés de *V. vinifera* sont sensibles à la FD mais manifestent des degrés divers de sensibilité. Une rémission naturelle, ou rétablissement, peut être observée sur des ceps malades protégés de nouvelles inoculations (21). Des vignes-mères de porte-greffe de diverses variétés se sont révélées porteuses d'une infection latente et capables de transmettre par greffe la maladie à des greffons sensibles de *V. vinifera* (25). Ces vignes-mères porteuses ont maintenu leur infectivité latente pendant plusieurs années. Le taux de transmission par des boutures de porte-greffe prélevées sur une même plante-mère est imprévisible (Fig 1), ce taux de transmission par différentes plantes-mères de porte-greffe d'une même parcelle peut aller de 6% à 80 %. Sur la base de ces éléments, on peut postuler que le délai d'expression retardée après contamination, l'intensité des symptômes et le processus du rétablissement d'un cep malade dépendent à la fois du comportement du cépage et de celui du porte-greffe (25).



**Fig. 1** – Distribution du phytoplasme de la FD phytoplasma dans les sarments d'une vignemère de porte-greffe démontrée par indexage de boutures ordonnées avec des greffons de Chardonnay sensible à la FD (collaboration ENTAV-INRA)

□ index sain    ■ index FD    ■ index mort

Les boutures greffées sur les porte-greffe infectés expriment le plus souvent leurs symptômes en pépinière. Cependant, quelques plantes peuvent contenir une infection latente pendant plusieurs années. Les données expérimentales montrent que l'expression de symptômes peut prendre au moins trois ans (Tableau 1); en outre, des observations au vignoble basées sur des éléments objectifs suggèrent qu'une latence de 5 à 7 ans pourrait n'être pas exceptionnelle.

En résumé, il semble que les réactions de défense des ceps soient irrégulières; elles dépendent probablement du cultivar ou du cépage des deux partenaires greffon et porte-greffe. Etant donné que ni l'état de colonisation par le phytoplasme ni sa répartition dans la plante ne sont prévisibles, l'échantillonnage du matériel pour détection par l'indexage ou par les tests de laboratoire ne peut être fiable. En outre, le titre en phytoplasmes dans les tissus de la plante peut demeurer quelque temps sous un "seuil d'expression de symptômes" et sans doute aussi sous le seuil de sensibilité des méthodes de détection.

#### **Biologie de la cicadelle vectrice et biologie de la transmission par le vecteur**

La diffusion rapide de la FD au sein d'une parcelle de vigne est à attribuer à l'activité d'ampélophage exclusif de son vecteur spécifique, la cicadelle *S. titanus*.

*S. titanus* est une espèce monovoltine possédant cinq stades larvaires. Les femelles gravides insèrent leurs oeufs dans les craquelures de l'écorce des bois de deux ans et entre les écailles des bourgeons. Les éclosions commencent en France au début de mai et peuvent durer jusqu'à 8 semaines. La durée moyenne entre deux mues est de 10 jours. Les larves aptères se nourrissent sur la face inférieure des feuilles de vigne. En fonction des conditions climatiques, les premiers adultes peuvent apparaître dès la mi-juillet; cependant, des larves de 5ème stade peuvent être observées jusqu'à la fin d'août. Les adultes femelles apparaissent et persistent plus tard que les mâles et déposent leurs pontes jusqu'à leur mort en septembre.

**Tableau 1** – Délai d'expression des symptômes dans des index de Chardonnay greffés sur des boutures de porte-greffe 3309C prélevées sur des vignes-mères reconnues ou non porteuses de FD, dans deux parcelles différentes (Collaboration INRA-ENTAV)

<b>Parcelle A</b>	Nbre de vignes-mères	Nbre de greffes	1ère année			2ème année <sup>(a)</sup>		3ème année <sup>(a)</sup>		Total FD %
			Morts	FD	FD %	Morts	FD	Morts	FD	
notés FD	34	268	14	29	10.8	1	3	3	1	12
non FD	18	362	2	0	0	1	2	0	0	0.5
Total	52	630	16	29	4.6	2	5	3	1	5.5

5

<b>Parcelle B</b>	Nbre de vignes-mères	Nbre de greffes	1ère année			2ème année <sup>(a)</sup>		3ème année <sup>(a)</sup>		Total FD %
			Morts	FD	FD %	Morts	FD	Morts	FD	
notés FD	27	209	16	7	3.3	5	7	2	1	7.1
non FD	87	692	54	0	0	6	4	4	2	0.6
Total	114	901	70	7	0.8	11	11	6	4	2.4

(a) Les plants morts ou FD en 2ème et 3ème année étaient sans symptômes respectivement en 1ère et en 2ème année

La propagation du phytoplasme de la FD dans le corps d'un vecteur expérimental a été étudiée (49). Les vecteurs acquièrent le phytoplasme en se nourrissant sur une plante infectée. Pendant l'acquisition, les phytoplasmes pénètrent dans le tube digestif avec le bol alimentaire. L'acquisition peut être réalisée en une seule prise mais l'infection qui en découle persiste pendant toute la vie de l'insecte. Toutefois, après l'acquisition se place une latence jusqu'au passage de l'insecte à l'état infectieux. Cette latence est le temps nécessaire au phytoplasme pour quitter l'intestin, traverser les barrières cellulaires et pénétrer dans les glandes salivaires. C'est alors que l'insecte devient infectieux. Il a été démontré que les phytoplasmes se multiplient dans les organes infectés de l'insecte, en particulier dans les cellules sécrétrices de salive (acini) (49, 50). Cependant, comme la transmission n'est pas verticale, la diffusion des phytoplasmes ne se produit que si chaque génération de l'espèce vectrice a la possibilité de les acquérir. Ce schéma de propagation du phytoplasme de la FD dans le corps du vecteur expérimental a été vérifié dans des spécimens de *S. titanus* (13).

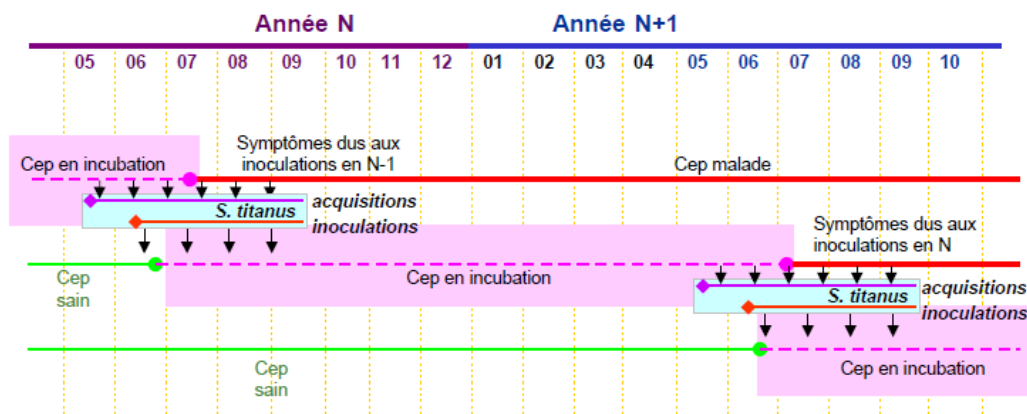
Cette transmission sur le mode "persistant, circulant, multipliant" suggère l'existence de reconnaissances moléculaires spécifiques entre les cellules de phytoplasmes et celles de l'insecte vecteur. Une étape d'adhésion cellulaire serait nécessaire à la pénétration des phytoplasmes à travers la paroi intestinale et dans les cellules sécrétrices des glandes salivaires (48, 49).

### **Biologie de la FD**

Les *Vitis sp.* sont les plantes-hôtes aussi bien du vecteur que du phytoplasme de la FD, caractères combinés qui favorisent un cycle d'infestation rapide du vignoble. L'acquisition et l'inoculation par le vecteur se produisent en été et l'incubation se déroule dans les ceps inoculés pendant l'automne, l'hiver et le printemps (Fig 2). Le taux de multiplication des souches malades au sein d'une parcelle est très élevé. Par exemple, le nombre de souches affectées dans une parcelle de Savoie a été multiplié par 20 entre 2000 et 2001 (62).

La période des acquisitions commence dès le début des éclosions. Une larve de premier stade née sur une souche infectée (que celle-ci montre ou non des symptômes), peut acquérir le phytoplasme de la FD dès son premier repas. Les spécimens infectés deviennent infectieux (c'est à dire capables d'inoculer lors de la prise de nourriture) 4 à 5 semaines après cette première acquisition, quel que soit le stade de développement atteint entre temps et ils demeurent infectieux jusqu'à leur mort. Ainsi, la période des transmissions peut débuter un mois après la naissance du premier spécimen (soit au début de juin) et elle se prolonge jusqu'à la mort des adultes en automne. Acquisition et transmission sont des événements de très haute efficacité.

Les souches de vigne infectées par des phytoplasmes constituent des réservoirs disponibles pour l'acquisition par l'insecte vecteur pendant sa période d'activité ainsi que des lieux de conservation des phytoplasmes durant le stage œuf hivernant de l'insecte. Comme les symptômes n'apparaîtront sur les nouvelles souches inoculées qu'au plus tôt pendant l'été de l'année suivante, le nombre de plantes montrant des symptômes pendant la phase d'expansion épidémique, est une sous-estimation du nombre effectif de plantes infectées incluant celles "en incubation". Les jeunes feuilles qui se développent au printemps sur les souches inoculées pendant l'été précédant, contiennent des phytoplasmes accessibles par prise de nourriture par les larves, avant même que les symptômes ne s'expriment. Les transmissions de cette nouvelle année peuvent donc commencer avant que les symptômes ne soient visibles. En outre, les souches de vignes-mères infectées peuvent jouer un rôle majeur dans le transport à distance de matériel de multiplication prélevé sur leurs bois en incubation (Fig 2).



**Figure 2** – Biologie de la transmission de la FD par *Scaphoideus titanus* et incubation hivernale du phytoplasme dans les ceps de vigne.

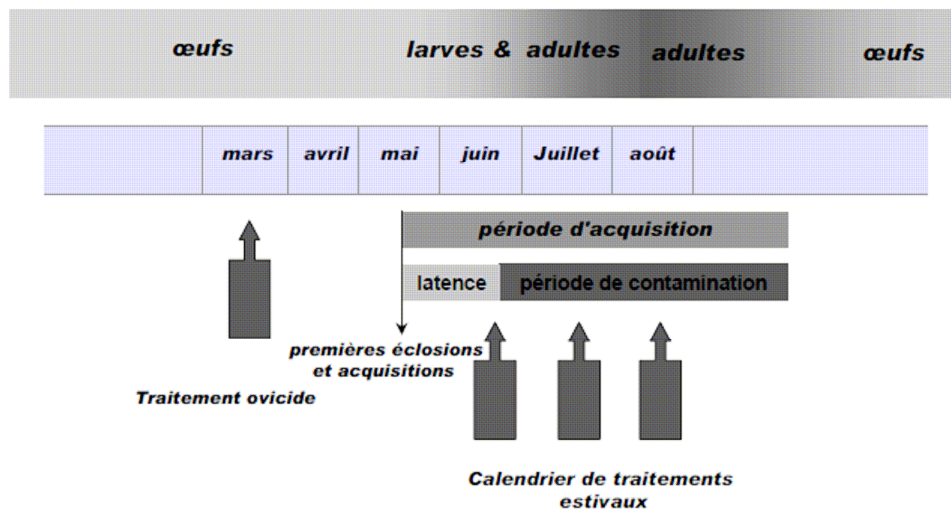
## LUTTE CONTRE LA FLAVESCENCE DORÉE

### Lutte indirecte contre la FD à travers la lutte contre son vecteur

La lutte contre *S. titanus* est facilitée du fait de sa présence sur une seule culture durant une période d'activité limitée à 4 à 5 mois.

La lutte contre *S. titanus* devrait être commencée de façon préventive, bien que l'espèce ne cause pas de dégâts directs, car elle peut atteindre des effectifs très élevés. La lutte "a posteriori" mise en œuvre après la déclaration des foyers de FD est toujours une course inégale contre la diffusion de la maladie qui a commencé la première. Bien évidemment, cette stratégie préventive ne sera pas mise en œuvre tant que des méthodes biologiques de limitation des populations ne seront pas disponibles, car aucune lutte chimique ne peut être mise en place si le danger n'est pas concrétisé.

Aucun auxiliaire de lutte biologique n'a été identifié en Europe. Ceci peut expliquer que les populations naturelles observées en Amérique du Nord n'atteignent aucunement les effectifs observés en Europe (53, 63). Une autre conséquence est que seuls actuellement des insecticides chimiques sont utilisables, à l'exception de deux spécialités à base de roténone homologuées en France, bien que leur effet de choc et leur rémanence soient faibles. Le calendrier de traitement par insecticides chimiques a été établi en France sur la base de ce qui est connu des phases essentielles de la biologie de la vécution du phytoplasme de la FD et du début de la phase critique des transmissions possibles (Fig 3). Le premier traitement doit impérativement être appliqué un mois au plus après le début des éclosions (entre la floraison et la nouaison de la grappe). D'autres mesures peuvent contribuer à diminuer les effectifs des populations : des traitements ovicides appliqués sur les troncs et les bois en période de pré débourrement (20, 61), la suppression des pampres de la base des ceps, où les larves trouvent refuge et des feuilles fraîches et tendres. Les périmètres de lutte doivent inclure les souches de vignes sauvages ou abandonnées.



**Figure 3** – Biologie de *Scaphoideus titanus* et calendrier d'interventions insecticides destinées à la lutte indirecte contre la FD, prenant en compte la biologie de la transmission de la FD. Le premier traitement estival ne doit pas être appliqué plus tard qu'un mois depuis le début des éclosions

### Prophylaxie des réservoirs de phytoplasmes

Les vignes (*Vitis sp.*) sont les seuls réservoirs potentiels identifiés des phytoplasmes de la FD *sensu stricto*. Les nouvelles transmissions commencent soit à partir d'un réservoir préexistant soit d'une source d'inoculum introduite.

Dans les régions confrontées à la première phase d'explosion épidémique de la FD, la prophylaxie doit comprendre les mesures d'élimination soignée des souches malades et des vignes sauvages et abandonnées. En France, l'arrachage des souches isolées et celui de la totalité de la parcelle si le taux de vignes malades un certain seuil (souvent fixé à 20%), sont rendus obligatoires par arrêtés préfectoraux.

Pour obtenir un assainissement complet du vignoble, la plantation de matériel végétal sain est une mesure critique parallèle à une lutte efficace contre le vecteur. C'est aussi une nécessité cruciale dans les vignobles encore indemnes où la cicadelle *S. titanus* est présente. En raison de la possibilité que des boutures ou des greffés-soudés soient en situation d'incubation de FD, l'assainissement du matériel de plantation est crucial. Il a été montré que le trempage dans l'eau chaude (50°C pendant 45 mn) (12, 23, 26) est une mesure efficace tuant les phytoplasmes et sans danger pour le matériel végétal, à condition que la température soit soigneusement régulée (50 +/- 0.2°C) et que le traitement soit placé de façon judicieuse dans la chaîne de production des plants (14) (Tableau 2).



Tableau 2. Conditions d'efficacité du Traitement à l'Eau Chaude pour la guérison de boutures de porte-greffe infectées par la FD et délais d'expression dans le matériel non guéri.

Conditions de traitement et lots de porte-greffe		pépinière 2000			vignoble 2001		
		plantés	repris	FD N (%)	plantés	repris	FD N (%)
Non traités	Lot 1	52	37	<b>6 (16%)</b>	22	22	<b>1 (4.5%)</b>
	Lot 2	204	182	<b>3 (1.7%)</b>	141	141	0
45°C / 60 mn	Lot 1	54	47	<b>3 (6.4%)</b>	39	39	0
	Lot 2	203	163	0	152	152	0
48°C / 30 mn	Lot 1	53	44	<b>3 (6.8%)</b>	36	36	<b>1 (2.7%)</b>
	Lot 2	202	157	0	138	138	0
50°C / 20 mn	Lot 1	53	36	0	33	33	<b>1 (3.1%)</b>
	Lot 2	204	160	0	144	144	0
50°C / 45 mn	Lot 1	51	47	0	42	42	0
	Lot 2	205	168	0	140	140	0

Lot 1: boutures de porte-greffe prélevées sur des vignes-mères notées FD; lot 2 : boutures de porte-greffe prélevées sur des vignes-mères de la même parcelle, non notées FD. Tout le matériel de chaque lot a été récolté le même jour et réparti au hasard pour subir les différentes conditions de traitement. Tout le matériel a été indexé avec des greffons sains de Pinot noir d'un même clone. Les greffés-soudés replantés en 2ème année ne montraient pas de symptômes en pépinière.

## DÉTECTION ET CARACTÉRISATION DU PHYTOPLASME DE LA FD

### Ecologie et évolution

Les phytoplasmes de la FD sont biologiquement définis comme des phytoplasmes associés à des symptômes de jaunisse chez *V. vinifera* et transmis par la cicadelle *S. titanus*. Selon ces critères, des phytoplasmes apparentés détectés dans des ceps de vigne du cépage Scheurebe en Palatinat (Allemagne), où *S. titanus* ne vit pas, n'appartiennent pas aux phytoplasmes de la FD (55, 57).

Le phytoplasme de la FD a été classé au sein du groupe ribosomique représenté par la Jaunisse de l'orme, ou Elm yellows (groupe EY ou 16SrV). Tous les phytoplasmes de ce groupe ont pour hôtes des espèces végétales ligneuses pérennes, comme la vigne, l'orme,

l'aulne, la ronce (*Rubus*), le cerisier, ainsi que le jujubier (42, 74). La taille de leur génome est d'environ 680-820 kb, ce qui le situe parmi les plus petits génomes de phytoplasmes (660 - 1,130 kb) (58). Ce génome très petit peut être le reflet d'une dérive génétique pendant l'évolution des phytoplasmes. On peut en particulier, considérer qu'un génome de cette taille reflète l'ajustement de l'organisme à une niche écologique étroite. Ceci correspond bien à la situation des phytoplasmes de la FD qui sont transmis par une cicadelle ampélophage et qui sont de facto limités aux plantes-hôtes du genre *Vitis*.

### **Détection dans les insectes et les plantes**

Des méthodes de détection au laboratoire ont été élaborées et peuvent être utilisées en routine. Ce sont des méthodes sérologiques (ELISA) et des méthodes s'adressant à l'ADN comme la Réaction de polymérisation en chaîne (en anglais, PCR).

#### Méthodes sérologiques

Des anticorps ont été obtenus contre les antigènes de la membrane du phytoplasme de la FD (13, 73); ils ont permis la caractérisation des phytoplasmes dans les insectes vecteurs (13, 65) et dans la vigne (24). La sensibilité de l'ELISA dépend de l'avidité des anticorps; elle peut être accrue par des protocoles "sandwich" (DAS ELISA). L'extraction à partir de tissus de vigne infectée, d'antigènes accessibles aux anticorps est une étape cruciale (24).

Les anticorps ont été utilisés pour marquer les phytoplasmes *in situ* dans les cellules infectées des insectes et des plantes (49, 50, 51, 52) en combinaison avec la microscopie photonique ou électronique, ou dans des nouvelles méthodes mises au point pour repérer des sites d'attachement intervenant dans la reconnaissance de cellule à cellule (49).

L'immunisation des animaux demande des phytoplasmes purifiés ou semi-purifiés en quantités importantes (13, 72, 73). Cette exigence est difficile à satisfaire car les phytoplasmes ne sont pas cultivés. Des anticorps de bonne qualité ne sont souvent disponibles qu'en quantités limitées. En outre, on doit disposer de tests pour la surveillance des jaunisses dans les vignobles, qui soient moins spécifiques que l'ELISA, car le Bois noir et les autres JV qui produisent les mêmes symptômes que la FD, sont causés des phytoplasmes non apparentés qui ne sont pas détectés avec les anticorps contre la FD.

Les anticorps sont des outils précieux car les antigènes cibles sont des produits de gènes pouvant intervenir dans la spécificité. Par exemple, les résultats d'essais sérologiques utilisant des anticorps poly- ou monoclonaux contre la FD qui montrèrent l'existence d'isolats de FD différents mais proches, ainsi que leur parenté avec les phytoplasmes de l'orme (55, 65, 73), suggèrent que les antigènes cibles soient impliqués dans les interactions avec l'insecte vecteur.

Les anticorps sont ainsi des outils puissants et discriminants pour accéder à l'étude des caractères biologiques et biochimiques des interactions des phytoplasmes avec leurs hôtes.

#### Méthodes utilisant l'ADN : Amplification génique ou PCR

La détection des phytoplasmes par des méthodes basées sur la technologie de l'ADN ont commencé à se développer à la fin des années 80 (43, 46). Ces méthodes très sensibles ont été adaptées à la détection dans les tissus de vigne (30, 31, 54). Elles ont contribué à la compréhension de l'étiologie et de l'épidémiologie des Jaunisses de la vigne dans le monde (4, 9, 10, 31, 32, 35, 40, 45, 55, 66).

La mise au point d'une méthode PCR requiert l'identification d'un fragment d'ADN qui soit présent dans tous les organismes cibles avec une forte homologie de séquences. Des oligonucléotides choisis dans des zones conservées (c'est-à-dire ayant une forte homologie chez les organismes ciblés) et placés à chacune des extrémités du fragment d'ADN, sont utilisés comme "amorces" pour la synthèse d'un grand nombre de copies du fragment à l'aide

d'une ADN polymérase. Selon que le fragment choisi est présent dans tous les phytoplasmes ou dans les phytoplasmes appartenant à un groupe ou un sous-groupe particulier, les amorces élaborées serviront à la détection "universelle" ou "spécifique de groupe" des phytoplasmes (56). Les tests utilisant des amorces universelles sont adaptés à des enquêtes au champ (32). De même que des tests ELISA spécifiques pour la FD, ils sont mis en œuvre par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (LNPV de Colmar) dans des enquêtes nationales depuis 1996, dans le but d'évaluer l'importance respective de la FD et du BN dans les vignobles français. Toutefois, l'analyse RFLP des produits de la PCR est requise pour caractériser les phytoplasmes détectés (56). Une telle analyse est coûteuse et fastidieuse lorsque de nombreux échantillons sont examinés.

Contrairement aux anticorps, les amorces PCR, une fois leur séquence établie, sont faciles à produire chez des entreprises spécialisées. De nombreuses amorces pour la détection universelle ou spécifique des groupes connus ont été publiées en même temps que les protocoles de l'amplification PCR (1, 47, 56). L'identification du phytoplasme de la FD peut être obtenue par l'analyse RFLP de fragments d'ADN amplifiés dans le gène de l'ARNr 16S et l'espaceur inter génique 16S-23S. Plusieurs combinaisons d'amorces ont été proposées et les enzymes de restriction adéquates choisies pour différencier le phytoplasme de la FD des autres phytoplasmes associés aux JV (4, 9, 10, 31, 32, 35, 40, 45, 66) .

Une méthodologie alternative a été développée, par la construction d'amorces spécifiques pour le phytoplasme de la FD, qui amplifient des fragments clonés au hasard de l'ADN d'un isolat de phytoplasme de la FD (FD70) maintenu au laboratoire (30). Ces outils de détection se sont révélés spécifiques pour les phytoplasmes du groupe EY (33); ils ont permis de détecter des phytoplasmes apparentés à la FD dans des vignes malades de JV en Allemagne (55). Ils ont été combinés à d'autres outils pour obtenir des tests à deux fins utilisés pour les enquêtes épidémiologiques dans les vignobles malades. Ces tests "PCR multiplex" mettent en présence dans le mélange réactionnel, une paire d'amorces spécifiques pour la FD et une paire d'amorces spécifiques pour le BN, afin de détecter les deux maladies ensemble dans un même échantillon ou séparément dans des échantillons d'une même parcelle (33).

#### **Amélioration de la sensibilité de la détection**

Les tests décrits ci-dessus permettent la détection sensible des phytoplasmes dans la plupart des plantes-hôtes et dans la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) ou la fève (*Vicia faba*) dans lesquelles les isolats de phytoplasmes sont maintenus au laboratoire. Toutefois la détection sensible dans les arbres et dans la vigne est contrecarrée par le très faible titre en phytoplasmes et par des composés phénoliques accumulés dans les tissus malades, qui limitent l'efficacité de l'étape d'enrichissement des extraits en phytoplasmes et celle de l'extraction de l'ADN; ils peuvent aussi inhiber la réaction de PCR.

Méthodes d'extraction de l'ADN. Quelques laboratoires français et italiens ont comparé différents protocoles d'extraction et de purification de l'ADN (6 30, 33, 59, 68). Un protocole utilisant le 3% cethyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) dans du tampon Tris (1, 33), produit un ADN de bonne qualité et permet de traiter rapidement en une fois plusieurs échantillons en provenance du vignoble.

Protocoles PCR. La détection a été améliorée en utilisant des protocoles de PCR gigogne. On peut utiliser plusieurs combinaisons d'amorces. Des tests à large spectre utilisent deux paires successives d'amorces universelles pour amplifier l'ADNr 16S, puis l'analyse RFLP des produits de l'amplification après digestion avec des enzymes de restriction (1, 4, 56, 59). La détection spécifique des phytoplasmes de la FD et apparentés (groupe EY ou groupe 16SrV), est obtenue soit par la mise en œuvre successive d'une paire d'amorces universelles et d'une

paire d'amorces spécifiques pour les phytoplasmes du groupe EY, ces deux paires d'amorces étant situées sur l'ADNr 16S (1, 6, 56, 59) ou par l'amplification gigogne d'un fragment spécifique de la FD de l'ADN extra ribosomique (fragment FD9) (1, 6).

La comparaison de ces deux méthodes a montré une plus grande sensibilité de détection par la PCR-RFLP du fragment d'ADN ribosomique amplifié avec les amorces P1/P7 (37, 75) puis par les amorces 16r758f/M23Sr (41, 66), digéré avec l'enzyme de restriction *Tru9I* (1, 6). Toutefois, l'amplification gigogne du fragment FD9 est une méthode rapide évitant l'analyse RFLP. Sa sensibilité, en outre, a été récemment encore améliorée (Boudon-Padieu, non publié).

Des résultats d'essais combinant la comparaison de méthodes d'extraction et de protocoles PCR sont illustrés au Tableau 3.

### **Détection différentielle des phytoplasmes de la FD et du BN**

Nous avons déjà exposé que la FD (groupe EY) et le Bois noir (associé au phytoplasme du stolbur, groupe STOL), qui induisent des symptômes semblables dans la vigne, doivent être rapidement différenciés dans le cadre des mesures réglementaires contre la propagation de la FD. On peut différencier les deux agents pathogènes comme il l'a été exposé ci-dessus, par l'analyse PCR-RFLP de l'ADN ribosomique. Toutefois, l'utilisation de la RFLP en routine est chère et fastidieuse. Nous avons en conséquence proposé un protocole PCR gigogne multiplex afin d'amplifier l'un et l'autre de deux fragments d'ADN extra ribosomiques spécifiques de chacun des groupes EY et STOL, appelés respectivement FD9 et Stol11 (33). En plus des amorces FD9f/r et Stol11f2/r1 précédemment obtenues, de nouvelles amorces ont été désignées, internes à chaque fragment. La longueur des amorces a été choisie pour que les deux fragments soient amplifiés dans des conditions PCR semblables de température et de durée d'élongation. La concentration de chaque amorce a été ajustée en prenant en compte la spécificité individuelle de chacune d'elles pour que l'amplification des fragments FD et STOL se réalise avec une sensibilité comparable à chaque étape du test gigogne. Les conditions optimales ont été validées sur des ADN extraits de nombreux échantillons de vignes malades prélevés dans les vignobles touchés par la FD (Boudon-Padieu et al., non publié). Ce protocole sera transféré au Laboratoire National de la Protection des végétaux..

## **APPROCHE MOLÉCULAIRE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA FD**

La connaissance de la diversité écologique des souches de phytoplasmes dans la nature peut fournir des pistes d'exploration de l'épidémiologie des maladies induites par les phytoplasmes et empêcher le risque de diffusion des maladies à phytoplasmes par l'échange de germ plasm au cours du commerce national et international de matériel de plantation. Ce chapitre cherche à comprendre et décrire les différentes voies de diffusion de la FD, en partant de la comparaison des phytoplasmes de la FD avec des phytoplasmes non viticoles apparentés appartenant au même groupe (EY ou 16SrV).

### **Différentiation du phytoplasme de la FD et de phytoplasmes apparentés du groupe EY**

La parenté du phytoplasme de la FD avec les phytoplasmes de la Jaunisse de l'orme (Elm yellows) et l'existence de différents isolats de FD ont été d'abord révélés par l'analyse en immuno-empreintes (Western-blot) des protéines membranaires des phytoplasmes avec des anticorps spécifiques de la FD (64, 73).

Tableau 3 – Sensibilité de la détection du phytoplasme de la FD dans les tissus de vigne, comparant trois méthodes d'extraction de l'ADN et quatre protocoles de PCR gigogne pour l'amplification d'ADN ribosomique ou non ribosomique.

Dilution de l'ADN cible après l'extraction	procédures PCR et méthodes d'extraction (A, B, C) <sup>(a)</sup>											
	fragment ADNr P1/P7— U5/U3 <sup>(b)</sup>			fragment ADNr P1/P7 — M1/B6 <sup>(c)</sup>			fragment ADNr P1/P7 — F1R1(V)f/r <sup>(d)</sup>			ADN non ribosomique FD9 f2/r1 — FD9 f3/r2 <sup>(e)</sup>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	1	3	4	2	5	4	3	3	4	3	2	4
1 / 10	6	6	3	6	6	6	6	6	3	6	6	2
1 / 100	6	4	1	6	6	3	6	4	1	6	4	2
1 / 1 000	6	4	1	6	6	1	6	6	1	3	2	0
1 / 10 000	4	2	2	6	2	2	4	2	1	NT <sup>(e)</sup>	NT	NT
1 / 100 000	2	0	0	3	1	0	3	0	0	NT	NT	NT

Six ceps de vigne de différents cépages atteints de FD ont été échantillonnés pour former 6 lots répartis chacun en trois parts (soit 18 échantillons). L'ADN a été extrait de chacune d'elles par l'une de trois méthodes A, B et C. Chacun des 18 extraits d'ADN obtenu a été dilué en série de 1 à 10<sup>-5</sup> et utilisé comme cible dans 4 protocoles PCR différents. Les chiffres indiqués représentent le nombre d'échantillons d'ADN ayant répondu positifs parmi les 6 de chaque lot. Voir les références dans la littérature: (a) méthodes d'extraction: A (9, 30, 68); B (10); C (1, 33); amorces et protocoles PCR, (b): (4, 33); (c): (1, 41, 66); (d): (4, 47); e: (1, 33). Les protocoles (b) et (c) doivent être suivis d'une analyse RFLP pour identifier le produit PCR. Les protocoles (d) et (e) sont spécifiques pour les phytoplasmes du groupe EY. (e) NT= non testé

L'analyse RFLP du fragment extra-ribosomique FD9 amplifié dans des tissus de vignes malades issues de différentes régions et différents pays, a montré l'existence de différents isolats (33). Un isolat appelé FD88 (syn. FD92) est plus fréquent. Trois isolats (PGY) trouvés dans des vignes allemandes du cépage Scheurebe en Palatinat (55, 57), sont différents les uns des autres et différents des phytoplasmes de la FD *sensu stricto*. Il est aussi important de signaler ici que les phytoplasmes PGY ont été détectés aussi dans des aulnes sans symptômes à proximité des parcelles de vignes, et qu'ils ont pu être transmis expérimentalement à la vigne par des spécimens naturellement infectés d'une cicadelle de l'aulne, *Oncopsis alni* (57). Il faut insister sur le fait que la jaunisse PGY n'affecte qu'un petit nombre de ceps et ne s'étend pas.

Plus récemment, des comparaisons ont été faites au sein des phytoplasmes du groupe EY, entre 4 isolats trouvés dans les vignes françaises (FD70, FD92) (33) et italiennes (FD-C, FD-D) (59), trois isolats du Palatinat (PGY-A, PGY-B, PGY-C) et quatre isolats de référence maintenus dans la pervenche de Madagascar, provenant de l'aulne, de l'orme et du cannabis en Europe et en Amérique. Les comparaisons ont été faites à l'aide de la RFLP avec plusieurs enzymes de restriction, par la comparaison de la mobilité des hétéroduplex (HMA) et la comparaison des séquences, d'un fragment de l'ADNr 16S et du fragment extra ribosomique FD9. Les résultats ont montré que le FD92 de France et le FD-D d'Italie étaient identiques en tout (1, 2). Deux autres isolats de FD (FD70 et FD-C) se ressemblaient fortement et ressemblaient à ALY, un phytoplasme de l'aulne issu d'Italie (74). Ces 4 phytoplasmes FD *sensu stricto* ainsi qu'ALY appartiennent à un premier cluster. Les phytoplasmes allemands PGY (non transmis par *S. titanus*) forment un cluster distinct, distinct également de celui regroupant les phytoplasmes de la jaunisse de l'orme (1, 2).

En outre, un nouveau phytoplasme de la FD a été identifié et transmis en 2000 à des plantes tests par des spécimens sauvages de *S. titanus* capturés dans des vignes abandonnées et montrant des symptômes de FD dans le sud-ouest de la France. Cet isolat FD2000 est différent des autres isolats de FD *sensu stricto*, cependant il appartient au même cluster restreint défini par les phytoplasmes FD *sensu stricto* et ALY (Angelini et al., non publié).

Il serait sans doute très profitable d'examiner les produits du gène contenant le fragment FD9, puisqu'il semble y avoir une relation entre sa variabilité, la variabilité sérologique (65, 73) et des caractères épidémiologiques (59, 65). Il serait en particulier possible d'étudier les caractères de transmission en comparant l'efficacité de la transmission par les vecteurs naturels connus et des vecteurs potentiels.

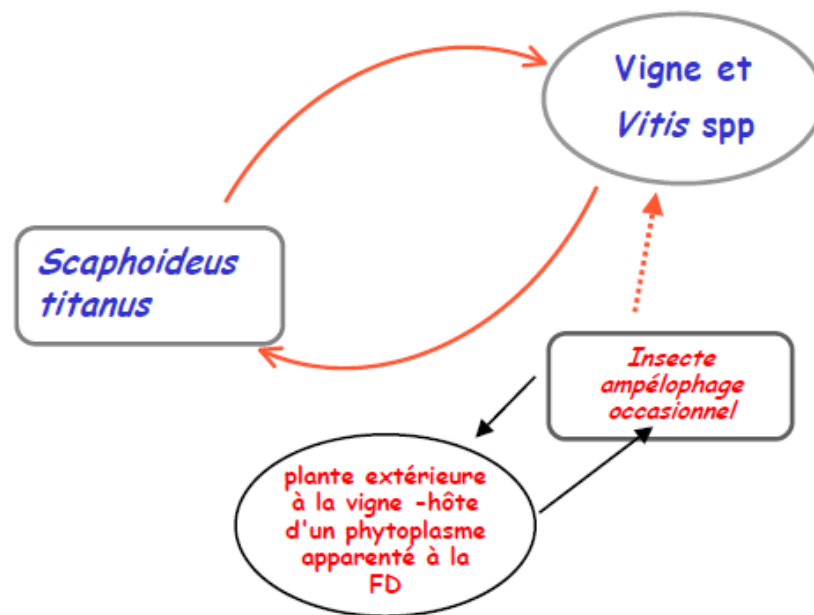
### **Questions sur l'origine de la Flavescence dorée**

Ces méthodes de différenciation fine entre phytoplasmes étroitement apparentés sont des outils utiles pour tenter d'élucider l'origine et la propagation de la FD durant les différentes phases de l'épidémie et dans les différentes régions qu'elle a touchées.

Lors de la première manifestation de FD pendant les années 50, l'agent pathogène a été présumé d'origine américaine, hypothèse basée sur l'origine américaine de l'espèce vectrice et sur l'introduction et la plantation sur leurs propres racines en Armagnac, d'hybrides américains producteurs directs, peu de temps avant la première observation de la FD en France. Au début des années 90, Maixner et al. (53) obtinrent des résultats suggérant fortement que des cicadelles *S. titanus* capturées dans des vignobles atteints de jaunisses dans l'état de New York, pouvaient transmettre à des plantes un phytoplasme reconnu par des anticorps spécifiques pour le phytoplasme de la FD. Toutefois, comme les méthodes utilisant l'ADN n'étaient pas disponibles à cette époque, nous manquons de résultats indiquant la présence de phytoplasmes apparentés à la FD dans les vignes de cette région américaine. Les données ne confirment pas mais n'excluent pas cette première explication de l'entrée de la FD en Europe.

Une origine américaine confirmerait également le rôle du matériel de plantation dans la propagation de la FD, qui est un phénomène bien connu. On peut se demander toutefois si cette voie fut la seule responsable de la diffusion de la FD en Europe à partir des premiers foyers d'infection européens du sud-ouest de la France dans les années 50. Une explication alternative de la formation de foyers infectieux primaires serait l'introduction accidentelle dans la vigne depuis d'autres espèces de plante-hôte. Est-ce que des résultats obtenus à l'aide d'outils moléculaires pourraient aider à élucider cette dernière possibilité et finalement à peser l'importance de chacune de ces deux voies possibles et non exclusives ?

**Possibilité de transmission accidentelle depuis des plantes-hôtes infectées extérieures au vignoble par des vecteurs occasionnels.**



**Figure 4** – Proposition sur un mécanisme d'introduction accidentelle d'un phytoplasme apparenté à la FD dans la niche *Vitis sp* – *Scaphoideus titanus*

Les travaux démontrant que *O. alni* peut transmettre de façon occasionnelle de l'aulne à la vigne un phytoplasme apparenté à la FD furent la première démonstration qu'un phytoplasme de ce groupe pouvait être introduit dans la vigne depuis une source extérieure (57). Une seconde étape vers une diffusion épidémique serait la transmission de ce nouveau "phytoplasme viticole" par un vecteur efficace, comme *S. titanus* (Fig 4). Ceci ne se produit pas en Palatinat puisque *S. titanus* n'y vit pas; en outre, des essais répétés pour obtenir l'acquisition de ces isolats PGY du Palatinat à partir de ceps Scheurebe infectés et leur transmission à des vignes saines, par des spécimen sains de *S. titanus* éclos en élevage, ont été infructueux (Boudon-Padieu et Maixner, non publié), ce qui suggère, à défaut de le démontrer, que ces phytoplasmes PGY peuvent ne pas être transmissibles par *S. titanus*.

Des résultats plus récents montrant qu'un isolat italien de phytoplasmes de l'aulne, ALY, est plus proche d'isolats de FD *sensu stricto*, suggèrent que des phytoplasmes non viticoles, une

fois introduits accidentellement dans la vigne par leur propre vecteur, puissent diffuser dans le vignoble s'ils sont suffisamment apparentés à la FD et transmissibles par *S. titanus*.

Les axes de recherches se dirigent vers les déterminants génétiques et cellulaires des phytoplasmes FD *sensu stricto* qui commandent leur transmissibilité par *S. titanus*.

### Propagation de la FD par le matériel de plantation

Tableau 4 – Présence d'isolats de FD *sensu stricto* dans des échantillons de vigne récoltés en France et en Espagne de 1996 à 2000.

Origine des échantillons de vigne	Nbre d'échantillons	Nbre d'isolats de type FD92	Nbre d'isolats de type FD70	Nbre d'isolats de type FD2000
Languedoc-Roussillon / Cataloña (Espagne)	36	36	0	0
Poitou-Charentes	3	2	0	1
Aquitaine	21	12	1	8 <sup>(a)</sup>
Savoie	21	19	0	2
<b>TOTAL</b>	<b>81</b>	<b>69</b>	<b>1</b>	<b>11</b>

(a) FD2000 a aussi été identifiée dans des cicadelles *S. titanus* captures dans le même vignoble

L'apparition de la FD dans des régions isolées comme la Corse dans les années 60 ou la Savoie en 2000, démontre l'introduction par le matériel de plantation infectée, telle qu'elle aurait pu se produire depuis l'Amérique vers l'Europe. Afin d'obtenir des informations sur les isolats de FD présents dans les principales régions françaises infectées, nous avons procédé à la caractérisation des phytoplasmes détectés dans de nombreux échantillons de vignes récoltés au cours d'enquêtes durant les dernières années. Tous ces échantillons furent examinés pour le polymorphisme des fragments de restrictions (RFLP) de la région FD9. Les résultats ont montré que l'isolat FD92 était présent avec une fréquence élevée dans toutes les régions (Tableau 4). Par ailleurs, Martini et al. (59), ont observé que la FD-D (identique à la FD92 sur tous les critères examinés) était largement présente en Italie avec une fréquence élevée.

Ces résultats corroborent les observations directes qui indiquent que la cause principale de la diffusion de phytoplasmes de la FD au cours des dernières décennies, est la propagation par les échanges commerciaux à grande échelle et sur de longues distances, de matériel de plantation infecté de façon erratique et latente. Etant donné le très grand nombre de plants produits et échangés, un très faible taux d'infection du matériel serait suffisant pour initier des foyers infectieux primaires au cœur des parcelles. Les populations très nombreuses de cicadelles *S. titanus* et leur intense activité de prise de nourriture sur les ceps de vigne sont certainement suffisantes pour induire à partir de ces "germes" une extension d'abord sournoise puis manifeste.



## CONCLUSIONS ET AXES DE RECHERCHE

Les caractères les plus frappants des épidémies de FD résultent de la spécificité et de la biologie de sa cicadelle vectrice. Cette espèce n'est qu'une des nombreuses espèces américaines appartenant au même genre et ayant une éthologie comparable, et qui vivent sur des *Vitis* sauvages (*V. riparia*) (40, 63). Il est remarquable que *S. titanus* ait trouvé en Europe des conditions des plus favorables pour sa multiplication et son extension sur *V. vinifera* et soit devenu une des plus importantes cicadelles présentes sur la vigne dans nos pays.

Les insecticides chimiques sont nocifs à la faune auxiliaire dans les vignobles et dans les cultures voisines. Des recherches sur des prédateurs et parasitoïdes de *S. titanus* sont en cours sans que l'on puisse présumer de leurs résultats (63). En tout état de cause, on ne peut attendre de la lutte biologique, l'éradication du vecteur ou l'ajustement des populations à un niveau acceptable. Dans le cas de vecteurs d'agents pathogènes ayant une aussi grande efficacité de transmission, le seuil admissible de population résiduelle après traitement devrait être proche de zéro.

Lors des premières épidémies de FD en France, la lutte chimique contre le vecteur a été combinée au rétablissement des ceps malades pour assainir les vignobles de façon progressive. Cette démarche ne peut plus être utilisée actuellement, car l'arrachage des ceps malades est obligatoire à cause de la progression rapide de la maladie et de l'étendue des zones colonisées par la cicadelle vectrice. Cette expérience antérieure peut néanmoins servir dans le choix des directions que devrait suivre la recherche afin de résoudre la lutte contre la diffusion de la FD. La recherche devrait se développer de façon harmonieuse sur les différents axes suivants :

- Rechercher les ennemis naturels et des insecticides biologiques capables de réduire les populations de *S. titanus* sans affecter la faune des insectes présents au vignoble.
- Améliorer l'évaluation de l'état sanitaire du matériel de plantation et les moyens de le maintenir de bonne qualité : sensibilité de la détection, rationalisation de méthodes d'échantillonnage pour des analyses statistiques.
- Comprendre les bases de la spécificité des interactions vecteur – phytoplasme. Des isolats de phytoplasmes transmissibles et non transmissibles par *S. titanus* pourraient être comparés au niveau moléculaire et dans leurs interactions cellulaires avec des vecteurs naturels et expérimentaux.
- Accroître les connaissances sur des facteurs épidémiologiques tels que les exigences éthologiques de *S. titanus* ou l'existence de réservoirs cryptiques de phytoplasmes apparentés à la FD facilitant leur introduction dans la vigne par des vecteurs occasionnels.
- Analyser les réactions de la plante à la colonisation par les phytoplasmes, incluant les interactions entre greffon et porte-greffe pendant le développement de la "résistance" et du rétablissement.
- Utiliser des éliciteurs pour activer les réactions de défense non spécifiques de la vigne pouvant intervenir lors de la colonisation par les phytoplasmes.

## LITTÉRATURE CITÉE

1. Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy – Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationship to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40(2):79-86.
2. Angelini E., Negrisolo E., Clair D., Borgo M., Boudon-Padieu E. Phylogenetic relationships among Flavescence dorée phytoplasma isolates and related phytoplasmas determined by Heteroduplex mobility assay and sequences of ribosomal and extra-ribosomal DNA. (submitted)
3. Baggiolini M., Canevascini V., Caccia R., Tencalla Y., Sobrio G. 1968. Présence dans le vignoble du tessin d'une cicadelle néarctique nouvelle pour la Suisse, *Scaphoideus littoralis* Ball. (Homoptera: Jassidae), vecteur possible de la Flavescence dorée. *Mitt. Schwei.Entomol. Gesell.*, 60:270-275.
4. Batlle A., Lavina A., Clair, D., Larrue J., Kuszala C., Boudon-Padieu E. 1997: Detection of Flavescence dorée in grapevine in Northern Spain. *Vitis* 36(4):211-212.
5. Barnett D.E. 1976. A revision of the Nearctic species of the genus *Scaphoideus* (Homoptera : Cicadellidae). *Trans Amer Ent Soc*, 102: 485-593.
6. Béjat A, Clair D, Angelini E, Boudon-Padieu E. 2001. Etude comparative de méthodes d'extraction et de détection moléculaire de phytoplasmes dans la pervenche de Madagascar et dans la vigne. 5ème congrès de la Société française de phytopathologie, Angers, 26-29 mars 2001. Programme et résumés des communications, 22.
7. Belli G., Fortusini A., Osler R, Amici A. 1973. Presence of a "Flavescence dorée" type disease in vineyards of Oltrepò Pavese. *Rivista di Patologia Vegetale*, Ser IV, 9 (suppl.) 50-56
8. Belli G., Fortusini A., Rui D. 1985. Recent spread of Flavescence dorée and its vector in vineyards of Northern Italy. *Phytopathol. Medit.* 24:189-191.
9. Bertaccini A., Vibio M., Stefani E. 1995. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopath Medit* 34:137-141.
10. Bianco P.A., Davis R.E., Casati P., Fortusini A. 1996. Prevalence of aster yellows (AY) and elm yellows (EY) group phytoplasmas in symptomatic grapevines in three areas of northern Italy. *Vitis*, 35(4):195-199.
11. Bonfils J., Schvester D. 1960. The leafhoppers (Homoptera-Auchenorrhynchas) and their relationship with vineyards in south-western France. *Annales des Epiphyties*, 11(3):325-336.
12. Borgo M., Murari E., Sartori S., Zanzotto A., Sancassani P., Bertaccini A. 1999. Termoterapia per eliminare i fitoplasmi da vite. *L'Informatore Agrario* 24:47-51.
13. 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. *Curr. Microbiol.*, 19:357-364.
14. Boudon-Padieu E., Grenan S. 2002. Hot water treatment. In "Methods". <http://www.icvg.ch>
15. Bournier A. 1976. Grape insects. *Ann Rev Entomol*, 22:355-376.
16. Bovey R., Martelli G.P. 1992. Directory of major virus and virus-like diseases of grapevines. Description, historical review and bibliography. Mediterranean Fruit Crop Improvement Council and International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the grapevine. Imprimerie FINZI, Tunis, June 1992, 86-106.
17. Carraro L., Loi N., Kuszala C., Clair D., Boudon-Padieu E., Refatti E. 1994. On the ability-inability of *Scaphoideus titanus* Ball to transmit different grapevine yellows agents. *Vitis* 33:231-234.
18. Caudwell A. 1965. La biologie de la Flavescence dorée et les fondements des mesures préventives. *Bul. techn. d'Inf. Serv. Agr.*, 198:377-388.
19. Caudwell A., Gianotti J., Kuszala C., Larrue J. 1971. Etude du rôle de particules de type "Mycoplasme" dans l'étiologie de la Flavescence dorée de la Vigne. Examen cytologique des plantes malades et des cicadelles infectieuses. *Ann Phytopathol*, 3(1):107-123.

20. Caudwell A., Brun P., Fleury A., Larrue J. 1972. Les traitements ovicides contre la cicadelle vectrice, leur intérêt dans la lutte contre la Flavescence dorée en Corse et dans les autres régions. *Vignes et Vins* 214, Nov. 1972, 5-10.
21. Caudwell A. 1961. Les phénomènes de rétablissement chez la Flavescence dorée de la vigne. *Annales des Epiphyties* 12:347-354.
22. Caudwell A., Larrue J. 1979. Examen du problème de la Flavescence dorée dans le cadre de la sélection sanitaire des bois et plants de Vigne. *Progrès Agricole et Viticole*, 1er Mars 1979, 128-134.
23. Caudwell A., Larrue J., Valat C., Grenan S. 1990. Les traitements à l'eau chaude des bois de vigne atteints de la Flavescence dorée. *Progrès Agricole et Viticole*, 107, 281-286.
24. Caudwell A., Kuszala C. 1992. Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de Flavescence dorée. *Research in Microbiology*, 143:791-806.
25. Caudwell A., Larrue J., Tassart V., Boidron R., Grenan S., Leguay M., Bernard P. 1994. Caractère porteur de la Flavescence dorée chez les vignes porte-greffes en particulier le 3309 C et le Fercal. *Agronomie* 14:83-94.
26. Caudwell A., Larrue J., Boudon-Padieu E., McLean G.D. 1997. Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Austral. J. Grape & Wine Res.*, 3:21-25.
27. Clerc L., Linder C., Gunthart H. 1997. Première observation en Suisse romande de la cicadelle *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera: Jassidae), vecteur de la flavescence dorée de la vigne. *Revue Suisse Vit. Arb. Hort.*, 29(4):245-247.
28. Credi R. 1994. Mycoplasma-like Organisms associated with a Grapevine yellows disease occurring in Italy. *J. Phytopathology* 141:113-120.
29. Credi R. 1994. Occurrence of anomalous Mycoplasma-like organisms in grapevine yellows-diseased phloem. *J. Phytopathology*, 142:310-316.
30. Daire X., Boudon-Padieu E., Bervillé A., Schneider B., Caudwell A. 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. Appl. Biol* 121:95-103.
31. Daire X., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E., Alma A., Arzone A., Carraro L., Osler R., Refatti E., Granata G., Credi R., Tanne E., Pearson R., Caudwell A. 1993. Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. *Vitis*, 32:247-248.
32. Daire X., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E. 1997. Survey for grapevine yellows in diverse European countries and Israel. *Vitis* 36 (1):53-54.
33. 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. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:507-514.
34. Daire X. 1994. Détection et différenciation de mycoplasma-like organism (MLO) associés aux maladies de la vigne de type jaunisse. Thèse Université de Bourgogne, 24 Juin 1994.
35. Davis R.E., Tanne E., Rumbos I.C. 1997. Phytoplasma associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup 16SRXII-A. *J Plant Pathol* 79:181-187.
36. Della Giustina W. 1989. In : Faune de France, 73, Homoptères Cicadellidae, Volume 3 (Compléments). INRA Ed, Paris, 198-200.
37. Deng S., Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *J Microbiol Methods* 14:53-61.
38. Gabrijel S. 1987. *Scaphoideus titanus* Ball (= *S. littoralis* Ball), novi stetniik vinove loze u Jugoslaviji. *Zastita Bija*, 38 (4):349-357.
39. Gärtel, W. 1965. Untersuchungen über das Auftreten und das Verhalten der flavescence dorée in den Weinbaugebieten an Mosel und Rhein. *Weinberg und Keller* 12:347-376.
40. Gibb K.S., Constable F.E., Moran J.R., Padovan A.C. 1999. Phytoplasmas in Australian grapevines – detection, differentiation and associated diseases. *Vitis*, 38 (3):107-114.

41. Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plants species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85:169-174.
42. Griffiths H.M., Sinclair W.A., Boudon-Padieu E., Daire X., Lee I.-M., Sfalanga A., Bertaccini A.. 1999. Phytoplasmas associated with elm yellows: molecular variability and differentiation from related organisms. *Plant Disease* 83(12):1101-1104.
43. Kirkpatrick B.C., Stenger D.C., Morris T.J., Purcell A.H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238:197-200.
44. Kuske C.R., Kirkpatrick B.C. 1992. Distribution and multiplication of western aster yellows mycoplasma-like organisms in *catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathology* 82:457-462.
45. Laviña A., Batlle A., Larrue J., Daire X., Clair D., Boudon-Padieu E. 1995. First Report of Grapevine Bois Noir Phytoplasma in Spain. *Plant Disease* 79(10):1075.
46. Lee I.-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of Mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.
47. Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 48:1153-1169.
48. Lefol C., Caudwell A., Lherminier J., Larrue J. 1993. Attachment of the Flavescence dorée Pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Ann Appl Biol.*, 123:611-622.
49. Lefol C., Lherminier J., Boudon-Padieu E., Larrue J., Louis C., Caudwell A. 1994. Propagation of the Flavescence dorée Mycoplasma-like organism in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J Invert Pathol.*, 63:285-293.
50. Lherminier J., Prensier G., Boudon-Padieu E. Caudwell A. 1990. Immunolabelling of grapevine Flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: A light and electron microscopy study. *J Histochem Cytochem.* 38:79-85.
51. Lherminier J., Courtois M., Caudwell A. 1994. Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence dorée Mycoplasma-like organisms in the plant host *Vicia faba* by ELISA and cytochemistry. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45:125-138.
52. 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.
53. Maixner M., Pearson R.C., Boudon-Padieu E., Caudwell A. 1993. *Scaphoideus titanus*, a possible vector of Grapevine Yellows in New York. *Plant Disease* 77:408-413.
54. Maixner M., Ahrens U., Seemüller E. 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Europ J Plant Pathology*, 101:241-250.
55. Maixner M., Rüdel M., Daire X., Boudon-Padieu E. 1995. Diversity of grapevine yellows in Germany. *Vitis* 34(4):235-236.
56. Maixner M., Daire X., Boudon-Padieu E., Laviña A., Batlle A., Reinert W. 1997. Phytoplasmas. In : *Les colloques, INRA Editions, N° 86. Sanitary Selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases*, 183-195.
57. Maixner M., Reinert W., Darimont H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis*, 39(2):83-84.
58. Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805-810

59. Martini M., E. Murari, N. Mori, A. Bertaccini. 1999. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease* 83:925-930.
60. Meignoz R., Boudon-Padieu E., Larrue J., Caudwell A. 1992. Flavescence dorée de la vigne. Présence de MLO et effets cytopathogènes associés, dans le liber de la vigne. *J Phytopath* 134, 1-9.
61. Moutous G., Fos A., Besson J., Joly E., Biland P. 1977. Résultats d'essais ovicides contre *Scaphoideus littoralis* Ball, la cicadelle vectrice de la Flavescence dorée. *Revue de Zoologie agricole et de Pathologie végétale*, 76(2):37-49.
62. Muckensturm N., Plant protection service of the Region Rhône Alpes. Personal communication
63. Nusillard B., Malausa J.C., personal communication
64. Osler R., Fortusini A., Belli G. 1975. Presence of *Scaphoideus littoralis* in vineyards of Oltrepo pavese affected by a disease of the type " flavescence dorée ". *Informatore Fitopatologico*, 25(6):13-15.
65. Osler R., Boudon-Padieu E., Carraro L., Caudwell A., Refatti E. 1992. First results to the trials in progress to identify the agent of a grapevine yellows in Italy. *Phytopath. Medit.* 31:175-181.
66. Padovan A.C., Gibb K.S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R.E., Magarey P.A., Sears B.B. 1995: Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasmas and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Aust J Grape Wine Res*, 1:25-31.
67. Pearson R.C., Pool R.M., Gonsalves D., Goffinet M.C. 1985. Occurrence of flavescence dorée like symptoms on "White Riesling" grapevines in New York, USA. *Phytopath Medit* 24:82-87.
68. Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I.-M., Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A., Credi R., Barba M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83:1130-1137.
69. Quartau J.A., Guimarães J.M., André G. 2001. On the occurrence in Portugal of the Nearctic *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae), the natural vector of the grapevine "Flavescence dorée" (FD). *IOBC/wprs Bulletin* 24 (7), 273-276. Proceedings of the meeting of the Working group "Integrated Control in Viticulture", Ponte de Lima (Portugal), 3-7 March 2000. Ed Carlo Lozzia. ISBN 92-9067-136-6.
70. Roure F. 2000. Flavescence dorée. La lutte sur 300 000 ha. *La Vigne*, 110, mai 2000:38-41 & 80-82.
71. Schvester D., Carle P., Moutous G. 1963. Transmission de la flavescence dorée de la vigne par *Scaphoideus littoralis* Ball. *Ann. Epiphyties* 14:175-198.
72. Schwartz Y., Boudon-Padieu E., Grange J., Meignoz R., Caudwell A. 1989. Obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'agent pathogène de type mycoplasme de la Flavescence dorée de la Vigne. *Res Microbiol*, 140:311-324.
73. 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. *Eur J Plant Pathol*, 102:757-764.
74. Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J Plant Pathol* 80(1):3-26.
75. Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemüller E., Kirckpatrick B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8):1988-1993.
76. Vidano C. 1964. Scoperta in Italia dello *Scaphoideus littoralis* Ball Cicalina americana collegata all "Flavescence dorée" della Vite. *Ital. agr.* 101:1031-1049.
77. Vidano C. 1966. Scoperta della ecologia ampelofila del Cicadellide *Scaphoideus littoralis* Ball nella regione nearctica originaria. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Torino*. III, 297-302.