



■ LA PROBLÉMATIQUE

Amélioration des outils de surveillance des jaunissements de la vigne

Les jaunissements de la vigne sont des maladies graves associées à plusieurs phytoplasmes, insectes vecteurs et plantes hôtes, répandues dans différentes régions de cultivation de la vigne. Collectivement, la flavescence dorée, le bois noir et les jaunissements de l'aster, sont considérés comme un modèle de maladies complexes basé sur de multiples variables (plantes hôtes de phytoplasmes et insectes vecteurs), chacune se comportant souvent différemment dans divers écosystèmes. Jusqu'à présent, la détection des phytoplasmes des jaunissements de la vigne s'est appuyée sur un ensemble de techniques moléculaires qui ciblent le génome de l'agent pathogène. Bien que ces techniques soient solides et fiables, le schéma de diagnostic est relativement coûteux et ne convient pas aux méthodes de surveillance à grande échelle. Des tests sérologiques ont donc été évalués dans le cadre des activités de TROPICSAFE en palliant la rareté de la protéine antigénique, en évaluant la sensibilité du test lorsque l'agent pathogène est présent à un faible titre et en comparant leur spécificité aux résultats obtenus avec l'identification moléculaire du phytoplasme.



• Plantes infectées par les jaunissements de la vigne.

■ DERNIERS RÉSULTATS DE LA RECHERCHE

Production d'anticorps spécifiques pour les phytoplasmes

Pour pallier la rareté des protéines antigéniques du phytoplasme, les activités de TROPICSAFE se sont concentrées sur la culture de phytoplasmes des jaunissements de l'aster de la vigne en milieu artificiel, et sur le développement de la synthèse de protéines antigéniques de la flavescence dorée à l'aide d'un système d'expression bactérien. Ces deux technologies ont permis de produire des préparations antigéniques adaptées à la production d'anticorps spécifiques contre les deux phytoplasmes. Ces anticorps sont maintenant disponibles pour concevoir de nouveaux tests sérologiques en complément de la détection moléculaire des phytoplasmes.

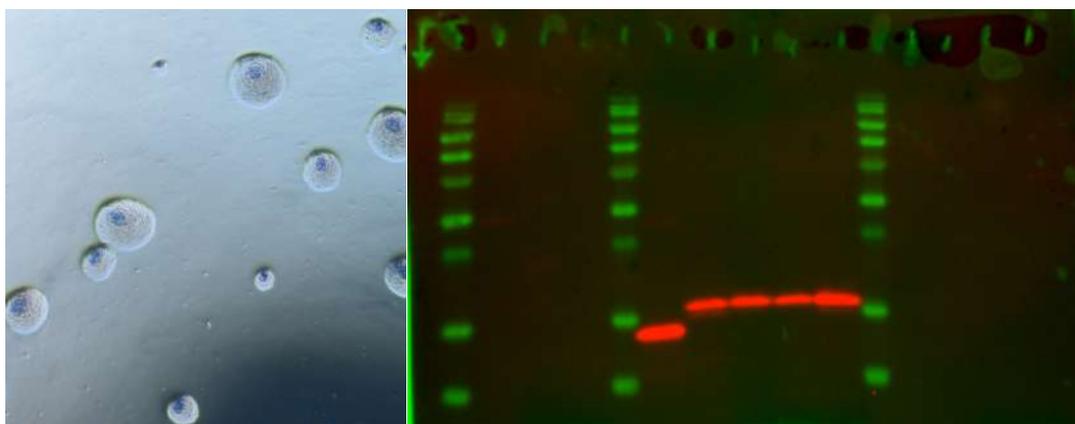


■ L'ACTIVITÉ RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT TROPICSAFE

Développement de tests sérologiques

Les anticorps ont été évalués pour des applications sérologiques, en donnant la priorité aux techniques à bas prix couramment appliquées dans les laboratoires de diagnostic de la vigne pour d'autres pathogènes.

Les anticorps contre les jaunissements de la vigne ont été utilisés pour des tests d'immunofluorescence (IFAS), une technique couramment exploitée pour détecter les bactéries. Un test immuno-enzymatique (ELISA) robuste a été développé pour les phytoplasmes de la FD: le protocole a défié pour ses performances de diagnostic le test de PCR quantitative. En outre, le test FD-ELISA a été évalué en testant toute une série d'échantillons, y compris des feuilles de vigne, des insectes vecteurs et des espèces végétales hôtes alternatives. L'évaluation des performances diagnostiques (spécificité et sensibilité) a été abordée par un double contrôle basé sur des échantillons identifiés de manière moléculaire.

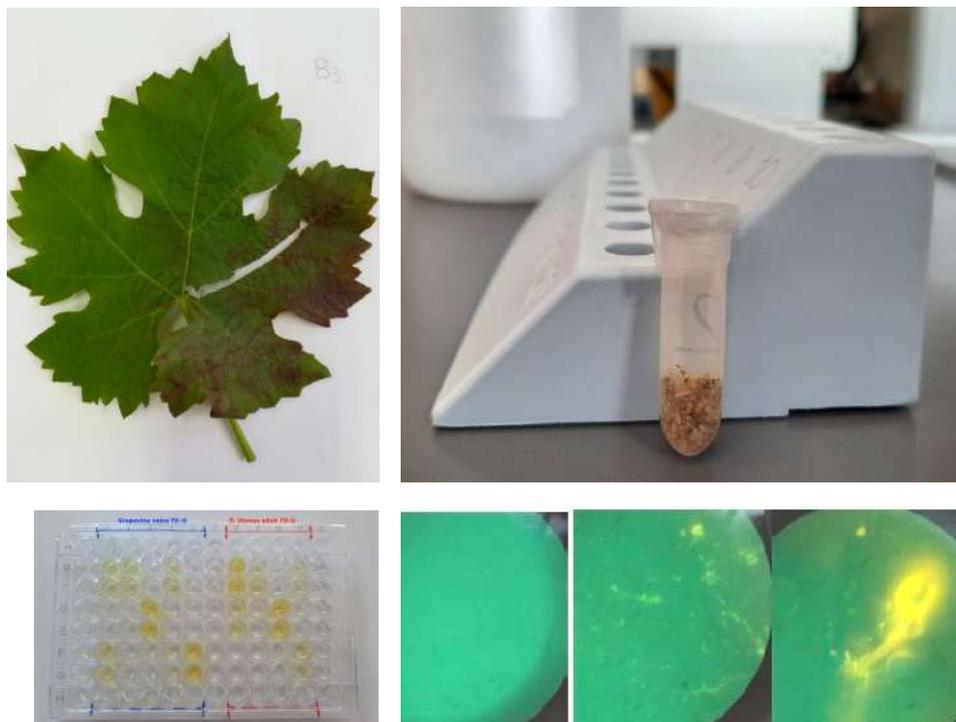


- À gauche: colonies de cellules des jaunissements de l'aster de la vigne se développant en milieu solide, photographiées en microscopie bifocale à 40 X, et utilisées comme préparation antigénique. A droite: analyse Western blot d'IgG anti-protéine recombinante flavescence dorée souche 16SrV-D (Trivellone *et al.*, 2019).

■ DONNÉES SCIENTIFIQUES ET PREMIERS RÉSULTATS

Test des anticorps contre les jaunissements de la vigne

Le test ELISA s'est révélé être fiable pour détecter spécifiquement la présence de la flavescence dorée dans les plants de vigne symptomatiques. Il fonctionne également pour tester le principal insecte vecteur du phytoplasme, *Scaphoideus titanus*, et les plantes hôtes alternatives *Alnus glutinosa* et *Clematis vitalba*. Au cours de trois années d'échantillonnage sur le terrain, deux tests ELISA pour la flavescence dorée, ciblant deux souches différentes, se sont révélés être 100% souche-spécifique par ELISA et ont été confirmés par qPCR. L'exclusion de réactions croisées entre les souches connues rend le test approprié pour l'identification des souches en une seule étape. Les valeurs de spécificité varient de 80% à 100%, selon l'échantillon (plante ou insecte), tandis que l'évaluation préliminaire a révélé une sensibilité de diagnostic de 58% à 64%. Bien que les valeurs de sensibilité semblent critiques, ce test ELISA pourrait être utilisé dans les programmes de surveillance comme dépistage préliminaire de grandes populations, à tester ensuite par des méthodes moléculaires plus sensibles telles que la qPCR. L'application de ce protocole permettra de réduire d'environ 50% le coût des grands programmes de dépistage. Enfin, des anticorps contre les jaunissements de l'aster de la vigne ont été testés par les méthodes ELISA et IFAS pour évaluer leur aptitude à la détection de phytoplasmes dans des échantillons de plantes. Les deux méthodes sérologiques employées ont montré une bonne spécificité pour les cultures de phytoplasme des jaunissements de l'aster tandis que le test IFAS a également donné des résultats prometteurs avec des tissus végétaux infectés.



- En haut à partir de la gauche: échantillons de vigne et *Scaphoideus titanus* adulte pour le test ELISA flavescence dorée. En bas à partir de la gauche: Résultats du test ELISA pour la flavescence dorée et la détection des jaunissements de l'aster de la vigne par IFAS sur des pervenches saines, une culture du phytoplasme des jaunissements de l'aster, du tissu de pervenche infecté par les jaunissements de l'aster (Contaldo *et al.*, 2019).

MOTS CLÉS

Production d'antisérum, flavescence dorée, jaunissements de l'aster, détection sérologique.

INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Regulation (EU) 2019/2072 of 28 November 2019. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj

Filippin L., Trivellone V., Galetto L., Marzachi C., Elicio V., Angelini E. 2019. Development of an anti-Imp serological assay for the detection of "flavescence dorée" phytoplasmas in grapevine, insect vectors and host plants. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1), 75-76.

Contaldo N., Freo I., Elicio V., Lucchese C., Formica L., Bertaccini A. 2019. Preliminary evaluation of the use of an antiserum obtained from phytoplasma culture. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1), 201-202.

Trivellone V., Ripamonti M., Angelini E., Filippin L., Rossi M., Marzachi C., Galetto L. 2019. Evidence suggesting interactions between immunodominant membrane protein Imp of "flavescence dorée" phytoplasma and protein extracts from distantly related insect species. *Journal of Applied Microbiology* 127, 1801-1813.

CRÉDITS

Lilia Formica - Agritest, Valenzano, Italie l.formica@agritest.it

Elisa Angelini - CREA Centre de viticulture et d'œnologie, Conegliano (Treviso), Italie elisa.angelini@crea.gov.it

Nicoletta Contaldo - *Alma Mater Studiorum* - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie nicoletta.contaldo2@unibo.it

Assunta Bertaccini - *Alma Mater Studiorum* - Université de Bologne, Département des sciences agricoles et alimentaires, Bologne, Italie assunta.bertaccini@unibo.it

Mars, 2021