

Et si *Scaphoideus titanus* ne pouvait plus transmettre le phytoplasme ?

Nathalie Arricau-Bouvery¹, Francesca Canuto¹,
Marie-Pierre Dubrana¹, Sybille Duret¹,
Stéphane Claverol², Sylvie Malembic-Maher¹
and Xavier Foissac¹

¹Univ. Bordeaux, INRAE, Biologie du Fruit et
Pathologie, UMR 1332, Villenave d'Ornon, France

²Univ. Bordeaux, Bordeaux Proteome, Bordeaux,
France

Rappels : Acquisition et transmission du phytoplasme

Acquisition



Vigne (cultivée ou sauvage)



Latence 4 semaines

Scaphoideus titanus

Transmission



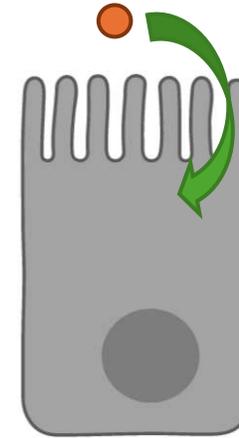
Rappels : Acquisition et transmission du phytoplasme

Dans 2 types de cellules de *S. titanus* :

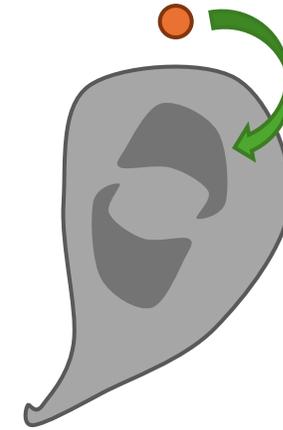
Acquisition



Latence 4 semaines



Cellule épithéliale de l'intestin moyen



Cellule des glandes salivaires

Quels sont les mécanismes moléculaires permettant l'invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme de la FD ?

Transmission

Vigne (cultivée ou sauvage)

Scaphoideus titanus

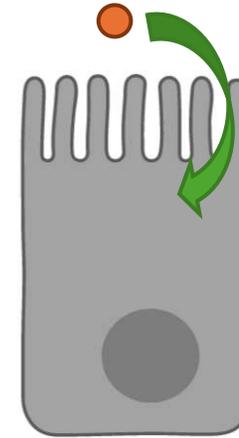
Rappels : Acquisition et transmission du phytoplasme

Dans 2 types de cellules de *S. titanus* :

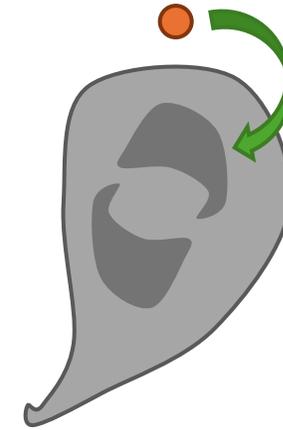
Acquisition



Latence 4 semaines



Cellule épithéliale de l'intestin moyen



Cellule des glandes salivaires

Quels sont les mécanismes moléculaires permettant l'invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme via le FD ?

Transmission

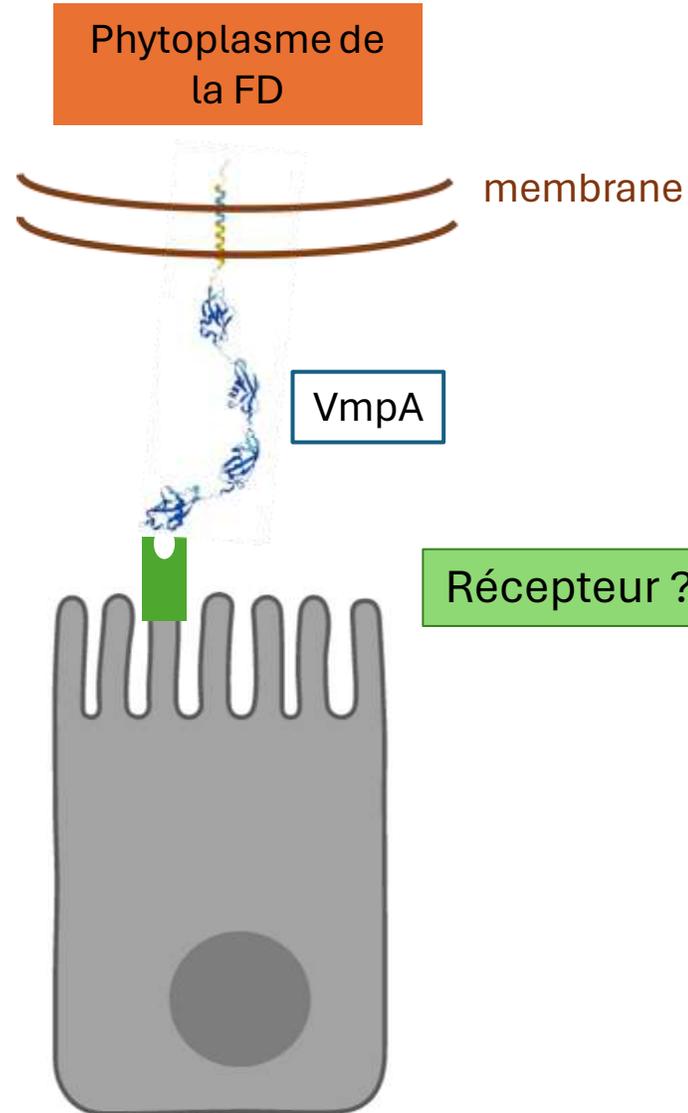
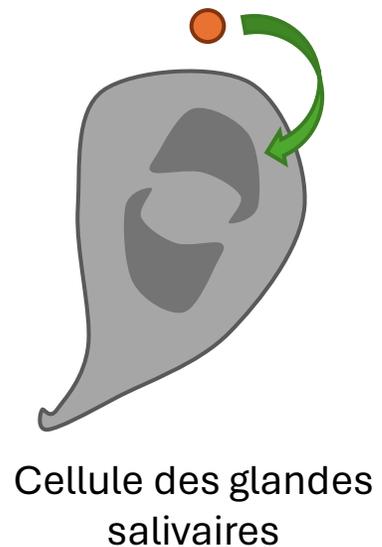


Supprimer ces mécanismes pour supprimer la capacité de vection de *S. titanus* (ou tout insecte vecteur si mécanismes spécifiques FD)

Vigne (cultivée ou sauvage)

Scaphoideus titanus

Question : quels mécanismes d'invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme de la FD ?

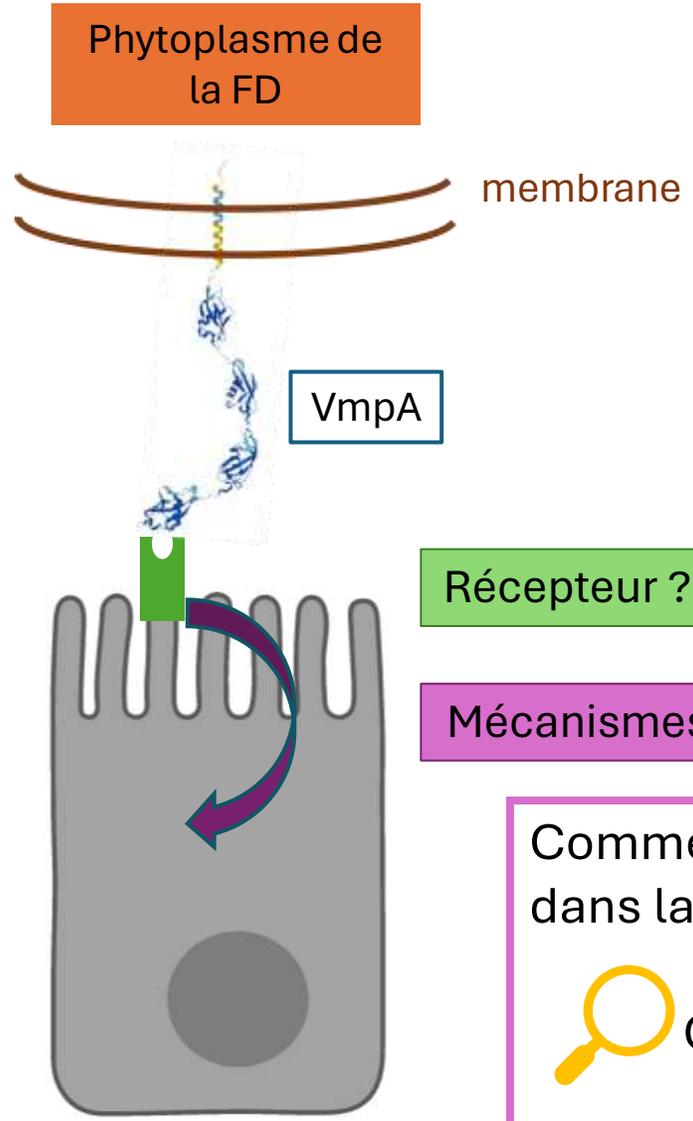
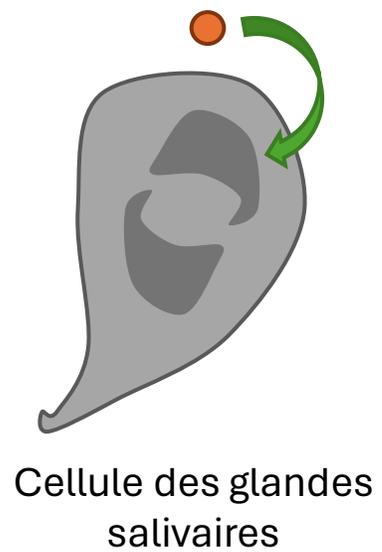


Comment fonctionne la reconnaissance phytoplasme / cellule insecte ?



Quelle est la protéine réceptrice de l'insecte ?

Question : quels mécanismes d'invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme de la FD ?



Comment fonctionne la reconnaissance phytoplasme / cellule insecte ?

Quelle est la protéine réceptrice de l'insecte ?

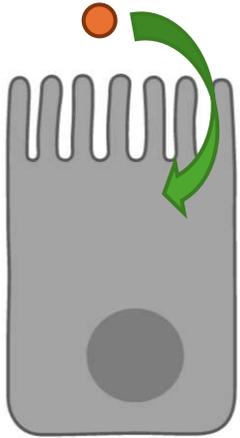
Mécanismes d'endocytose ?

Comment fonctionne l'entrée du phytoplasme dans la cellule de l'insecte ?

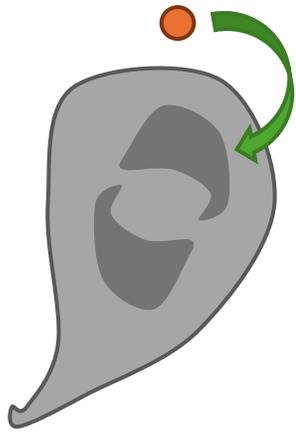
Quels mécanismes sont impliqués ?

Invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme de la FD

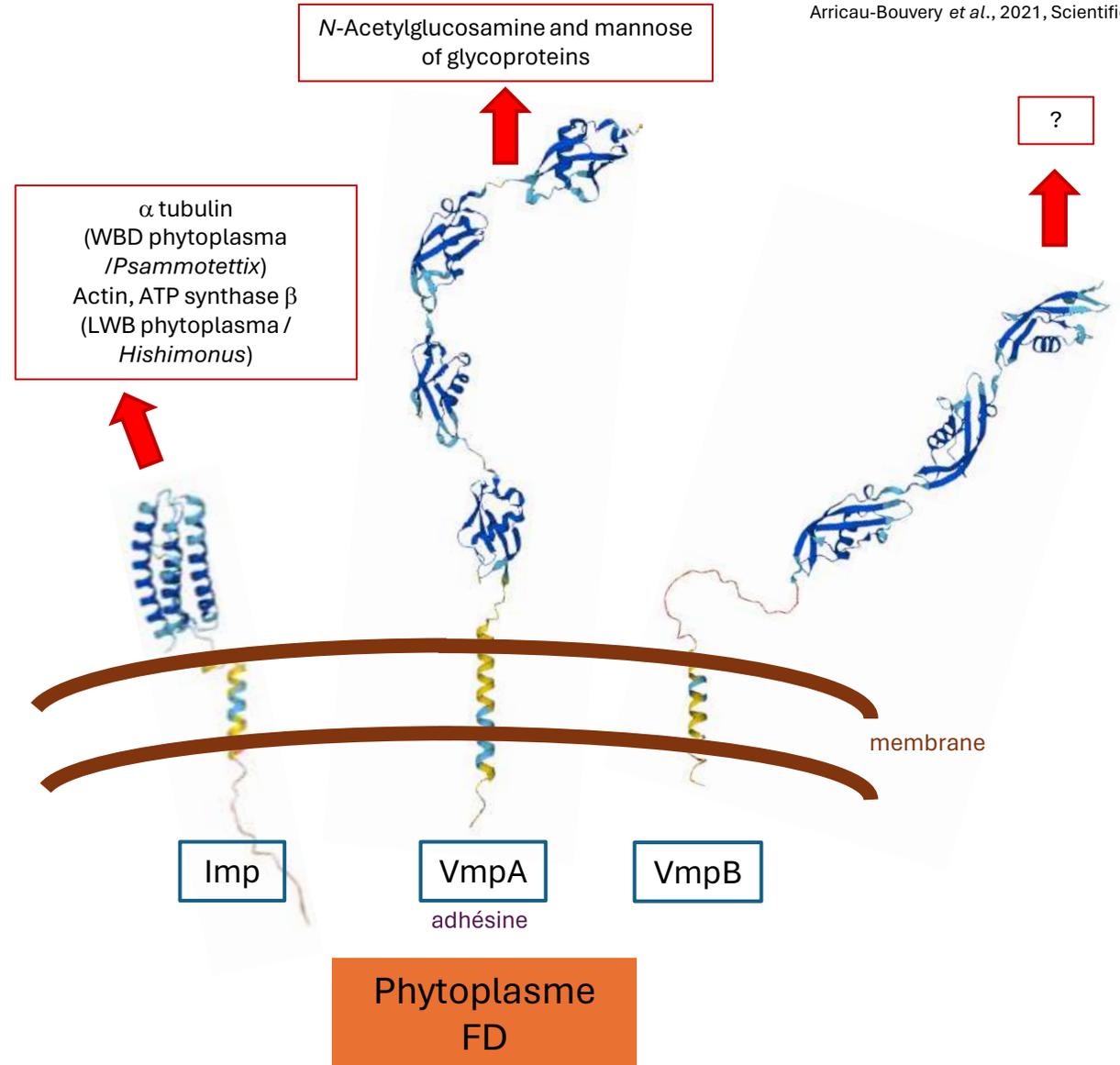
La membrane du phytoplasme est couverte de diverses protéines avec des fonctions plus ou moins identifiées :



Cellule épithéliale de l'intestin moyen

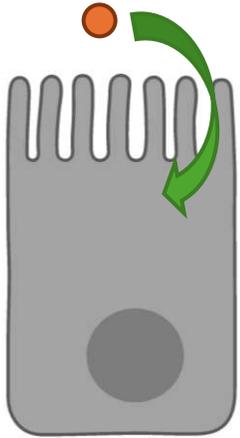


Cellule des glandes salivaires



Siampour *et al.*, 2011, Bull Insectology
Arricau-Bouvery *et al.*, 2018, Appl Environ Microbiol
Trivellone *et al.*, 2019, Appl Microbiol
Ding *et al.*, 2021, Eur J Plant Pathol
Arricau-Bouvery *et al.*, 2021, Scientific Reports

Invasion des cellules de l'insecte par le phytoplasme de la FD



Cellule épithéliale de l'intestin moyen

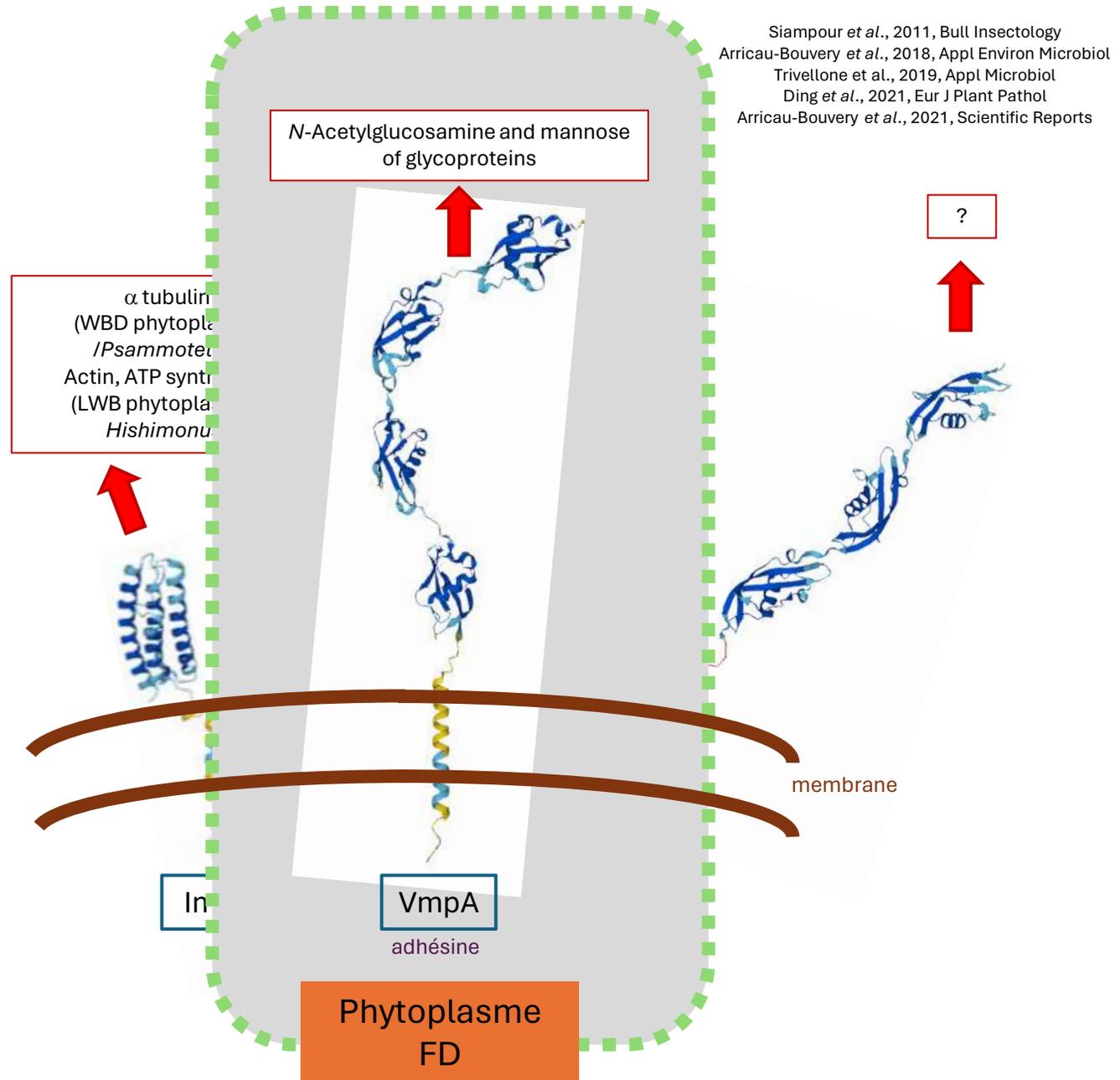


Cellule des glandes salivaires

La membrane du phytoplasme est couverte de diverses protéines avec des fonctions plus ou moins identifiées :

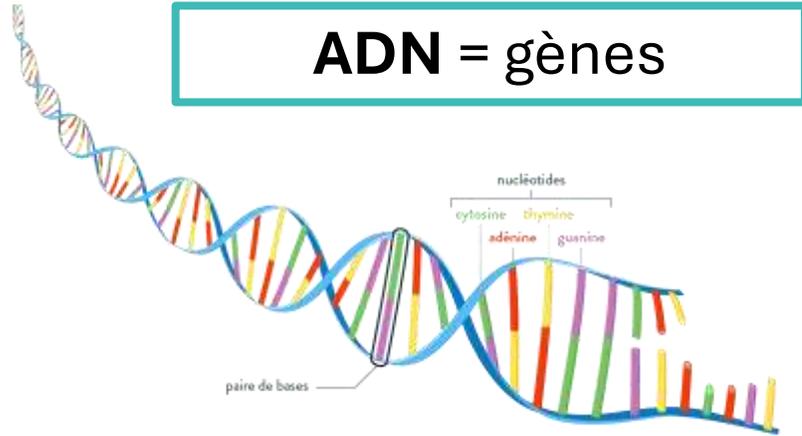


focus sur VmpA du phytoplasme



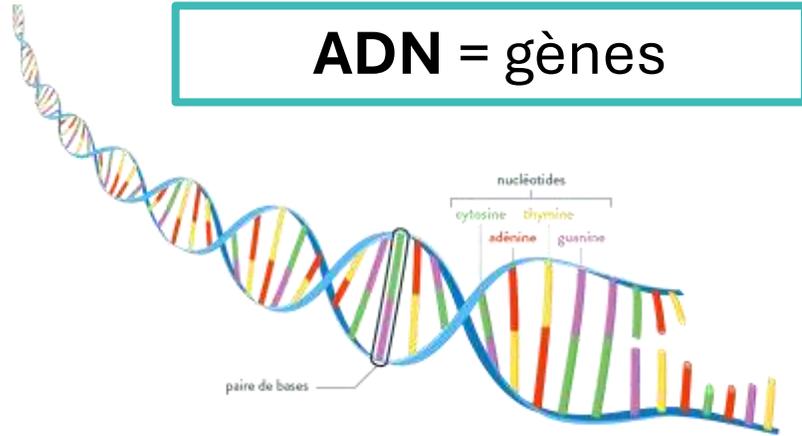
Siampour *et al.*, 2011, Bull Insectology
Arricau-Bouvery *et al.*, 2018, Appl Environ Microbiol
Trivellone *et al.*, 2019, Appl Microbiol
Ding *et al.*, 2021, Eur J Plant Pathol
Arricau-Bouvery *et al.*, 2021, Scientific Reports

ADN = gènes



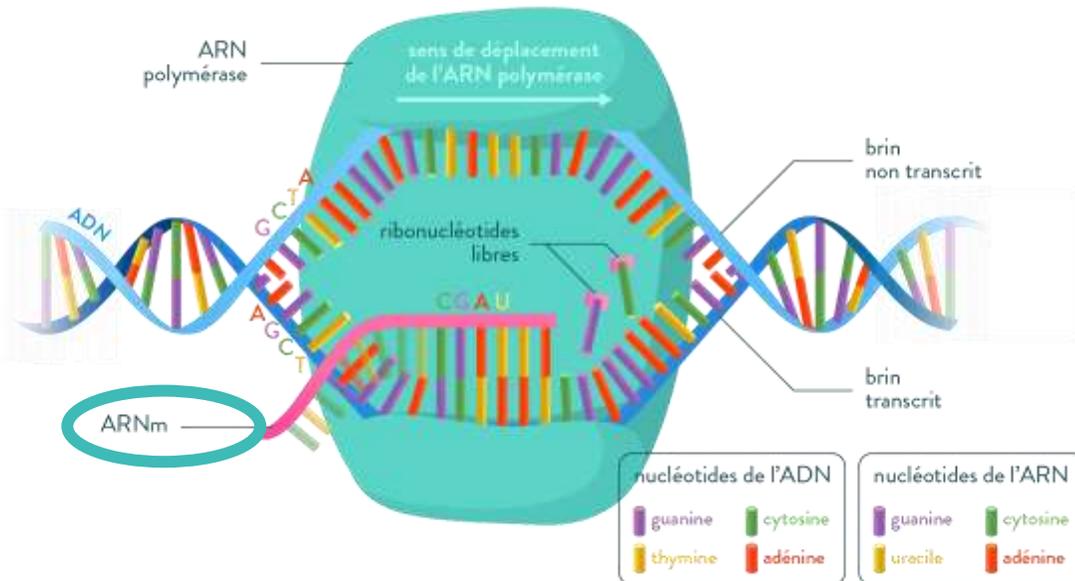
Rappels : principes de la production de protéines

ADN = gènes



© SCHOOLMOUV

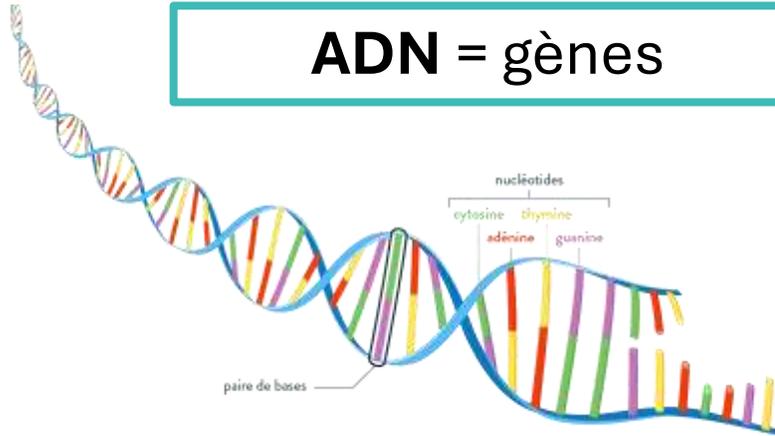
Transcription = fabrication de l'ARNm



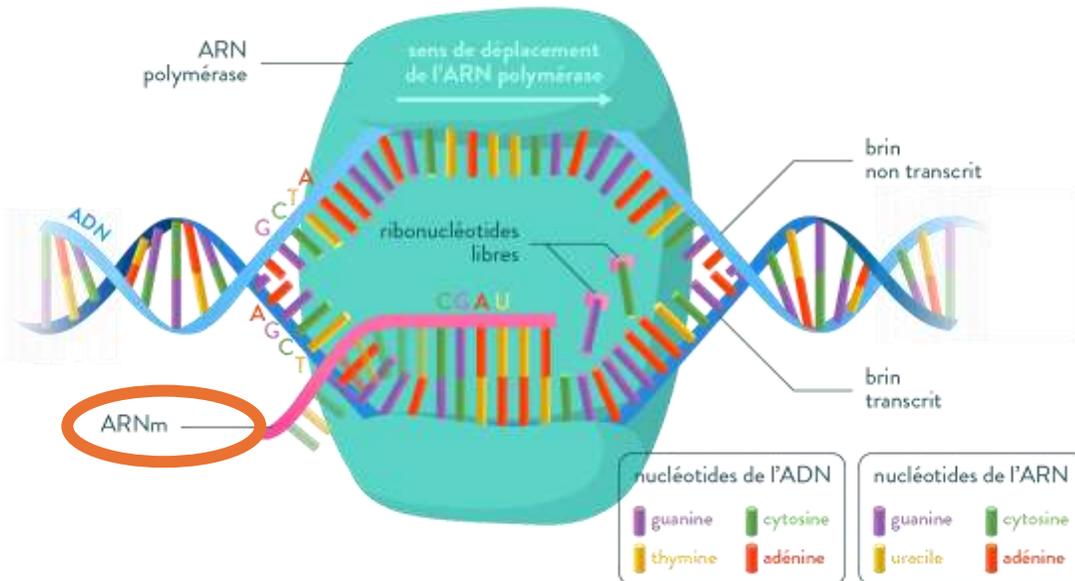
© SCHOOLMOUV

Rappels : principes de la production de protéines

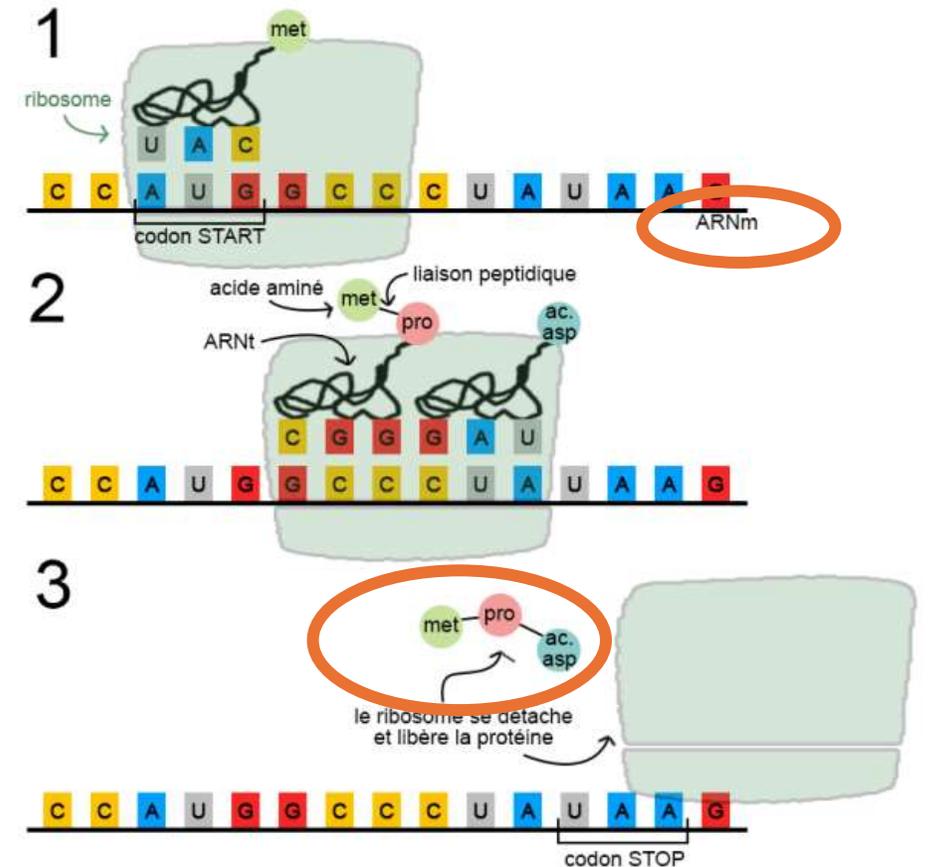
ADN = gènes



Transcription = fabrication de l'ARNm



Traduction = synthèse de la protéine codée par le gène



ARN maillon essentiel dans la production de protéines

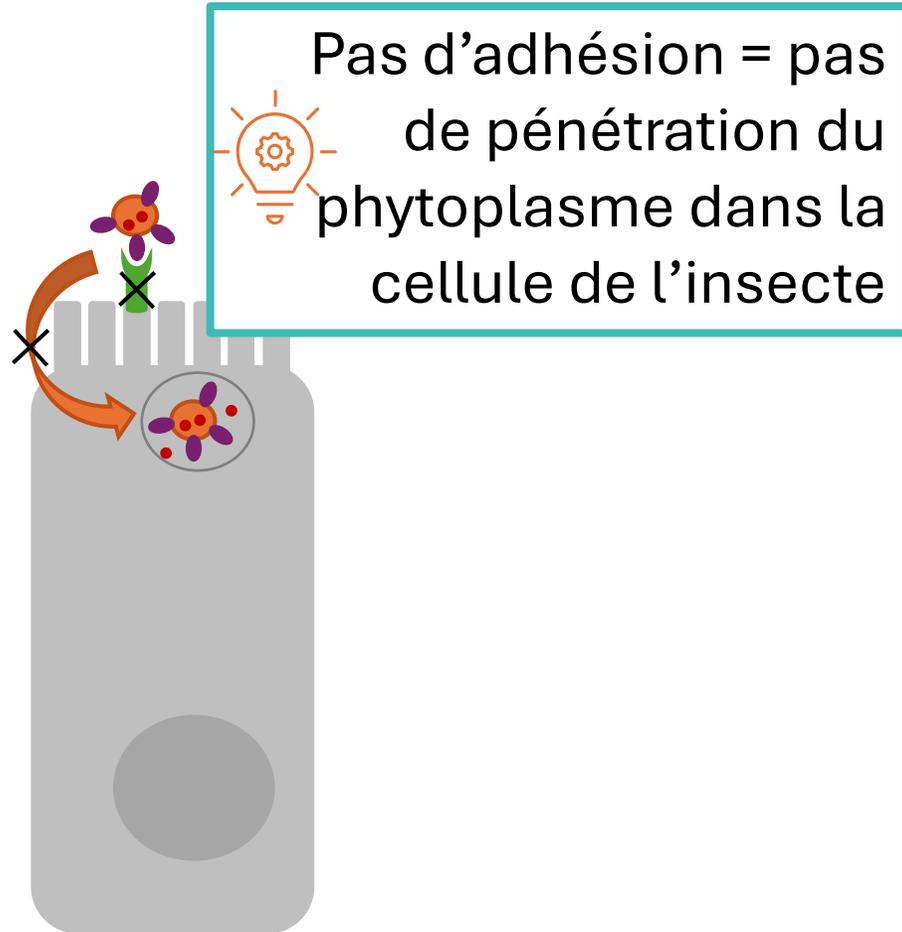


Si on empêche la fabrication d'un ARN lié à un gène = on n'a pas de synthèse de la protéine

Utilisation de la méthode ARN interférence

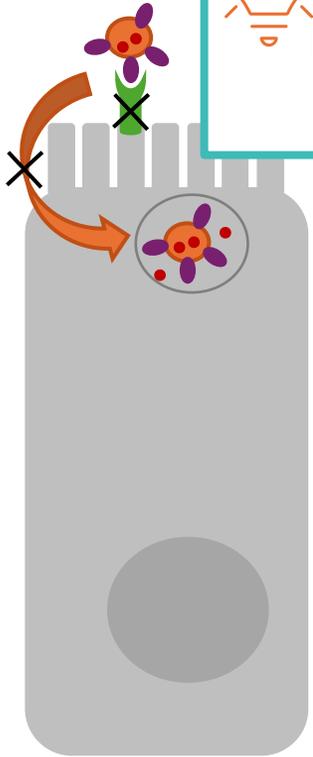


Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?



Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?

Pas d'adhésion = pas de pénétration du phytoplasme dans la cellule de l'insecte

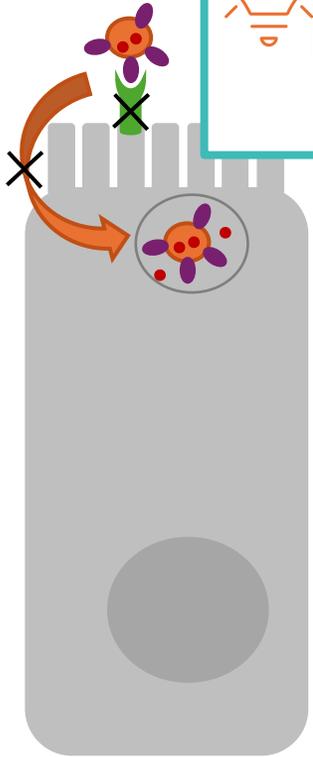


Sélection de 13 protéines interagissant avec VmpA

- endoplasmin (endo)
- HERC4 E3 ubiquitin-protein ligase (HERC4)
- tumor necrosis factor receptor super family member wengen (wengen)
- epidermal growth factor receptor (EGFR)
- lysosome membrane protein 2 (CD36-like)
- protein cueball (cueball)
- transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like (fasciclin)
- protein draper (draper)
- LRR domains (uk1_LRR)
- integrin β
- sodium/calcium exchanger 3-like (Na/Ca exchanger)
- leucine-rich repeat-containing protein 15-like (uk2_TLR)
- uncharacterized protein LOC124356975 (uk3)

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?

Pas d'adhésion = pas de pénétration du phytoplasme dans la cellule de l'insecte

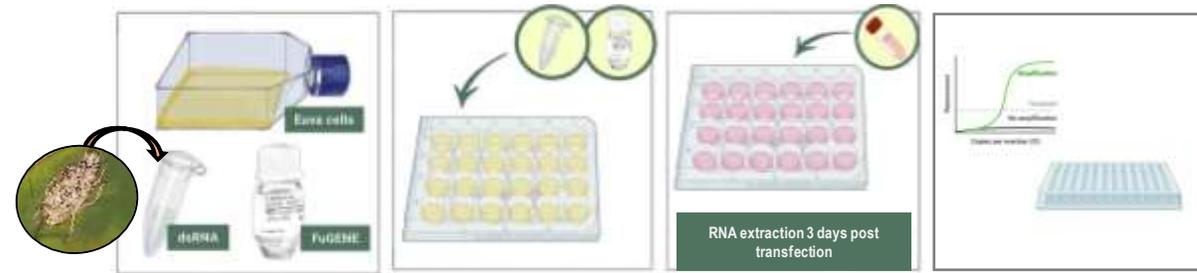


Sélection de 13 protéines interagissant avec VmpA

- endoplasmin (endo)
- HERC4 E3 ubiquitin-protein ligase (HERC4)
- tumor necrosis factor receptor super family member wengen (wengen)
- epidermal growth factor receptor (EGFR)
- lysosome membrane protein 2 (CD36-like)
- protein cueball (cueball)
- transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like (fasciclin)
- protein draper (draper)
- LRR domains (uk1_LRR)
- integrin β
- sodium/calcium exchanger 3-like (Na/Ca exchanger)
- leucine-rich repeat-containing protein 15-like (uk2_TLR)
- uncharacterized protein LOC124356975 (uk3)

Production des ARNdb codant pour ces 13 protéines

Essais sur cultures cellulaires



Production of dsRNA targeting each of the **13** selected targets (GFP as a negative control)

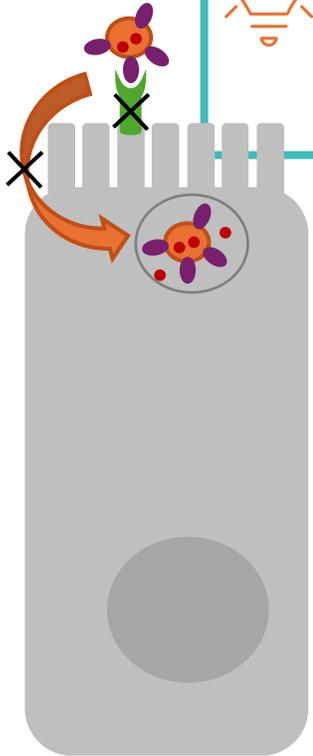
Transfection of Euva11 cells

RNA extraction

Real time RT-PCR

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?

Pas d'adhésion = pas de pénétration du phytoplasme dans la cellule de l'insecte



Sélection de 13 protéines interagissant avec VmpA

- endoplasmin (endo)
- HERC4 E3 ubiquitin-protein ligase (HERC4)
- tumor necrosis factor receptor super family member wengen (wengen)
- epidermal growth factor receptor (EGFR)
- lysosome membrane protein 2 (CD36-like)
- protein cueball (cueball)
- transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like (fasciclin)
- protein draper (draper)
- LRR domains (uk1_LRR)
- integrin β
- sodium/calcium exchanger 3-like (Na/Ca exchanger)
- leucine-rich repeat-containing protein 15-like (uk2_TLR)
- uncharacterized protein LOC124356975 (uk3)

Production des ARNdb codant pour ces 13 protéines

Essais sur cultures cellulaires



Production of dsRNA targeting each of the **13** selected targets (GFP as a negative control)

Transfection of Euva11 cells

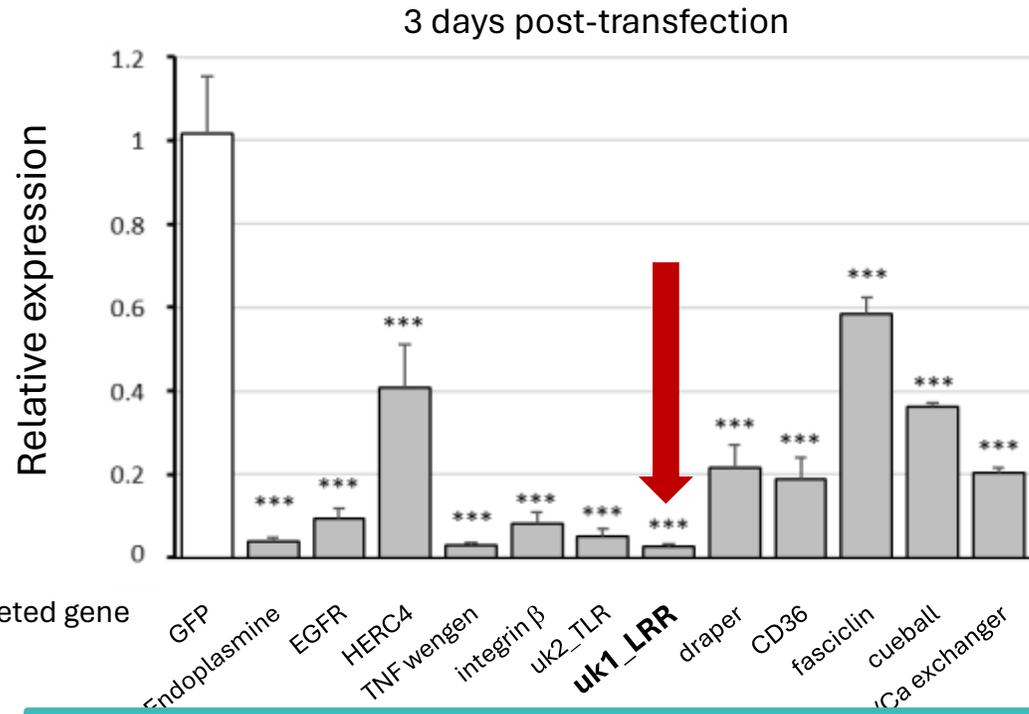
RNA extraction

Real time RT-PCR



Est-ce que la présence de ces ARNdb va perturber l'expression des gènes codant pour ces protéines ?

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?

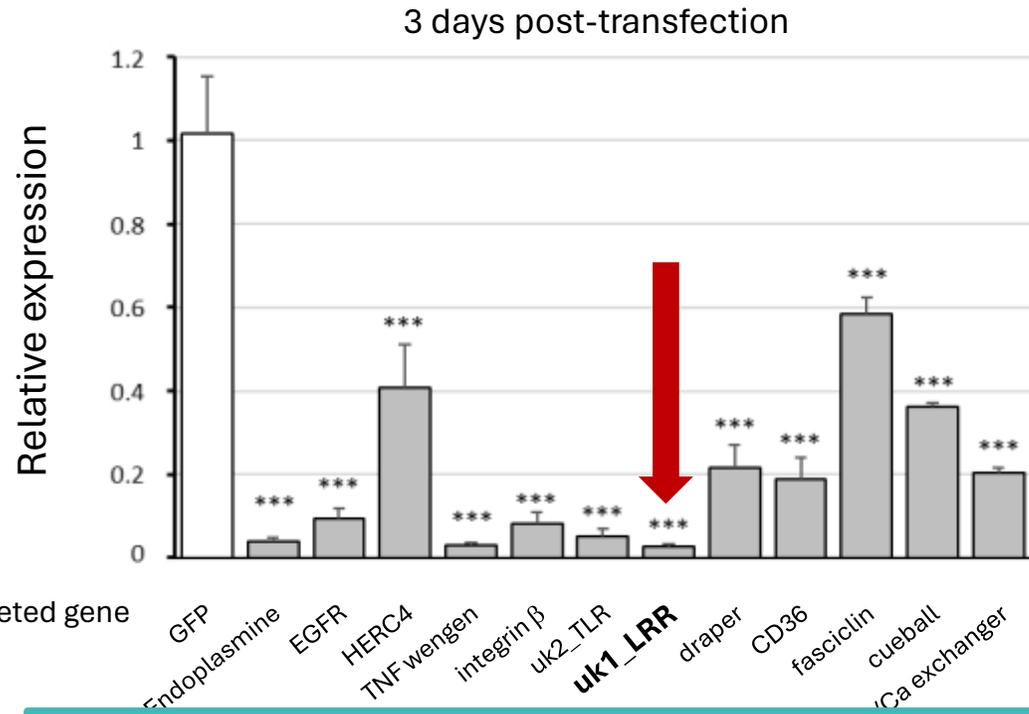


✓ **OUI!**

En particulier le gène uk1_LRR

- baisse de l'expression de 12 gènes sur les 13 ciblés
- variation de l'efficacité de l'ARNi selon les gènes

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?



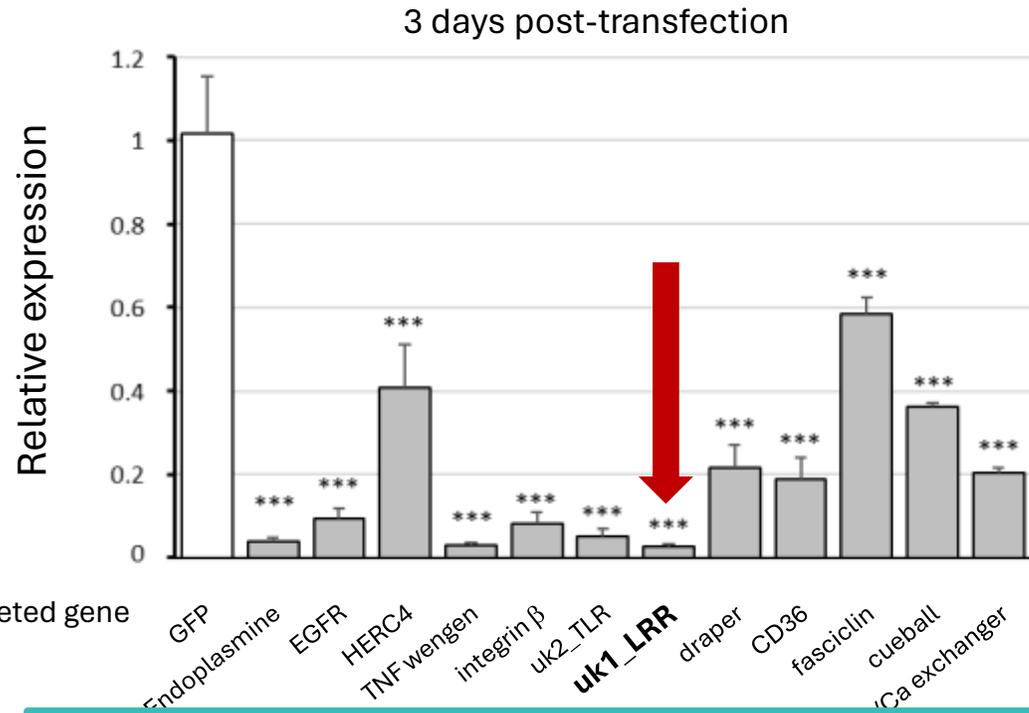
✓ **OUI!**

En particulier le gène uk1_LRR



A valider sur
insecte

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?



Est-ce que l'infection par la FD d'un insecte modifie l'expression du gène uk1_LRR ?

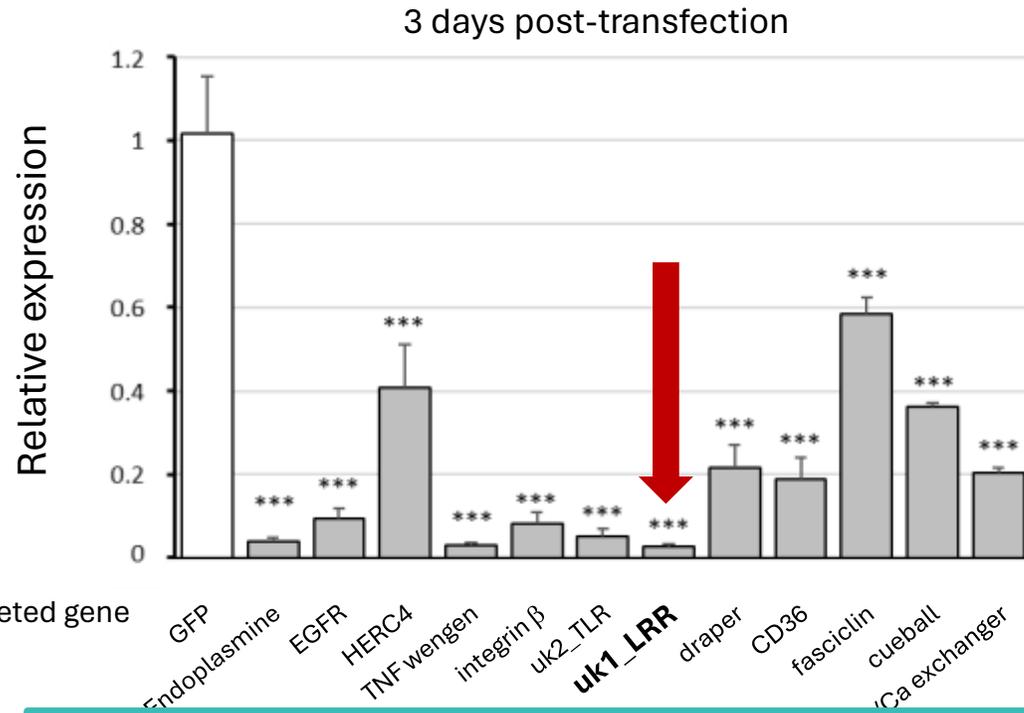
✓ **OUI!**

En particulier le gène uk1_LRR



A valider sur
insecte

Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?



✓ OUI!

En particulier le gène uk1_LRR

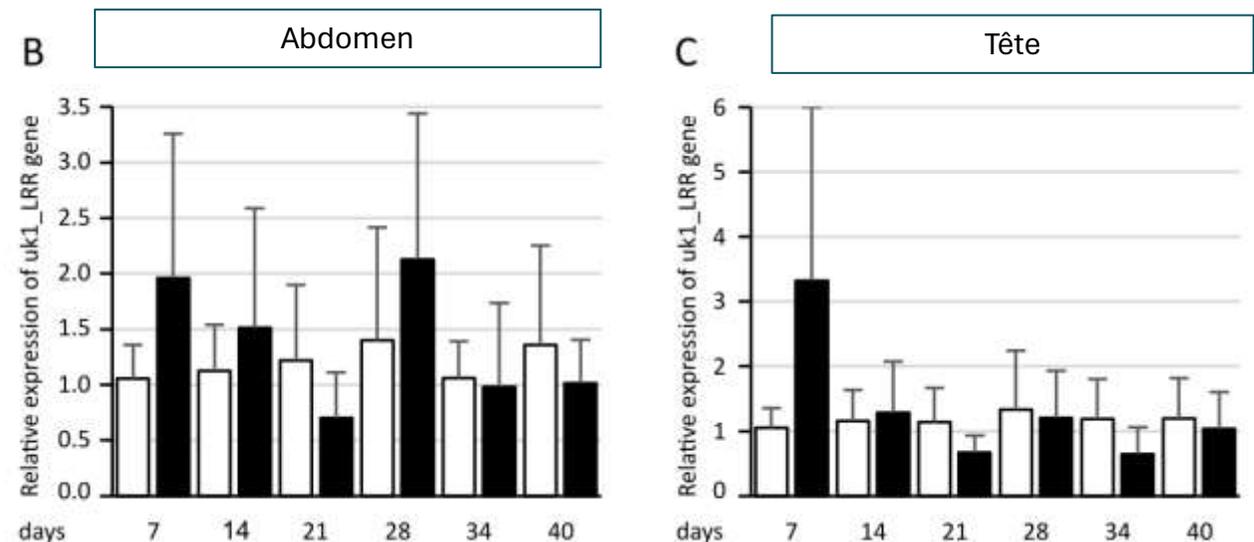


A valider sur insecte

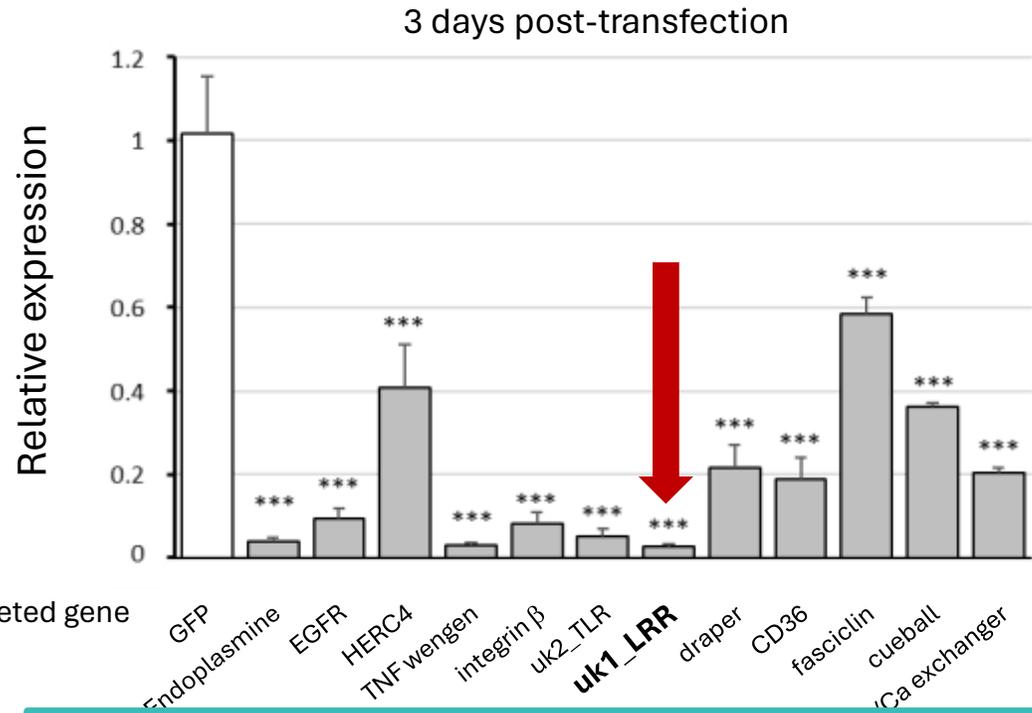


Est-ce que l'infection par la FD d'un insecte modifie l'expression du gène uk1_LRR ?

Comparaison de l'expression du gène uk1_LRR dans la tête et l'abdomen :
1- d'insectes se nourrissant sur des plants exempts de FD
2- d'insectes se nourrissant sur des pieds contaminés FD



Question : quelle est la protéine de l'insecte réceptrice de la protéine VmpA du phytoplasme ?



✓ **OUI!**

En particulier le gène uk1_LRR

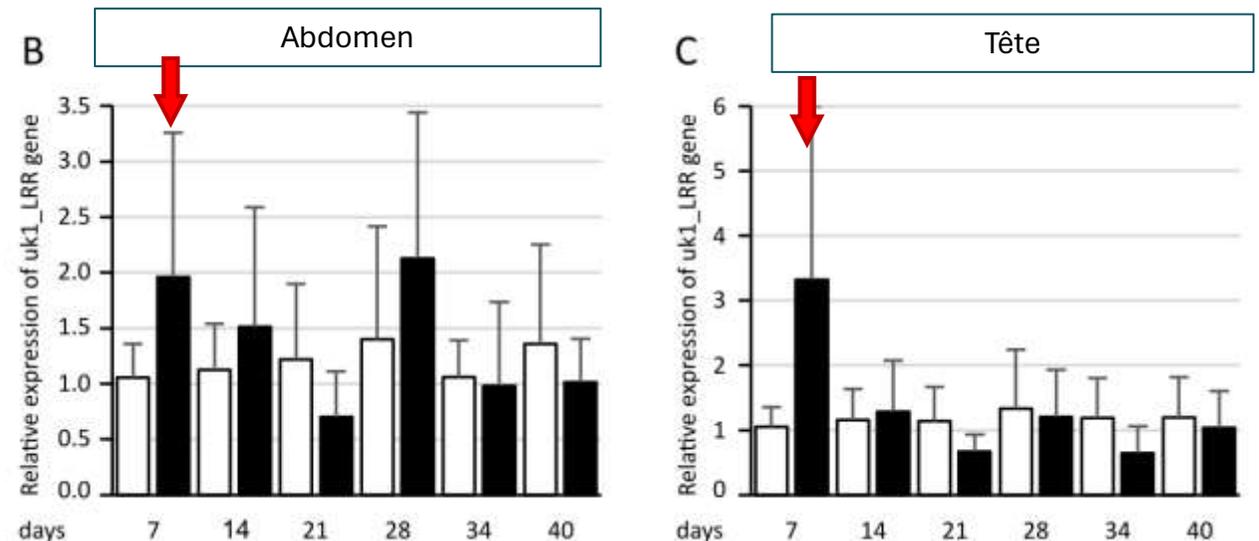


A valider sur
insecte



Est-ce que l'infection par la FD d'un insecte modifie l'expression du gène uk1_LRR ?

Comparaison de l'expression du gène uk1_LRR dans la tête et l'abdomen :
1- d'insectes se nourrissant sur des plants exempts de FD
2- d'insectes se nourrissant sur des pieds contaminés FD

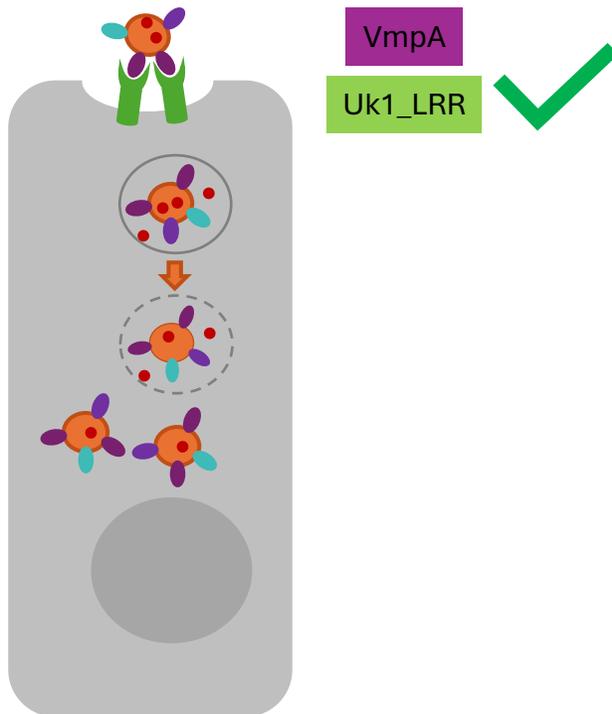


✓ **OUI!**

L'expression de uk1_LRR augmente dans les 1ers jours après infection

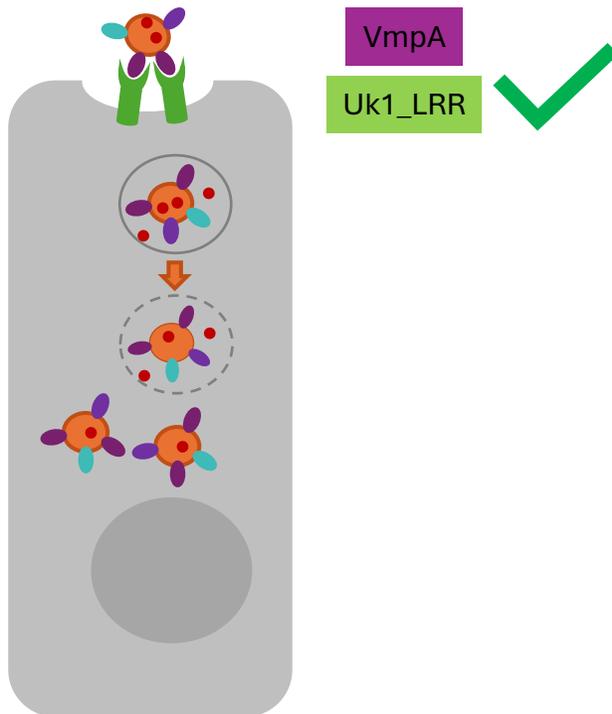
Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

La protéine uk1_LRR de l'insecte semble être un bon candidat pour être un récepteur pour le phytoplasme

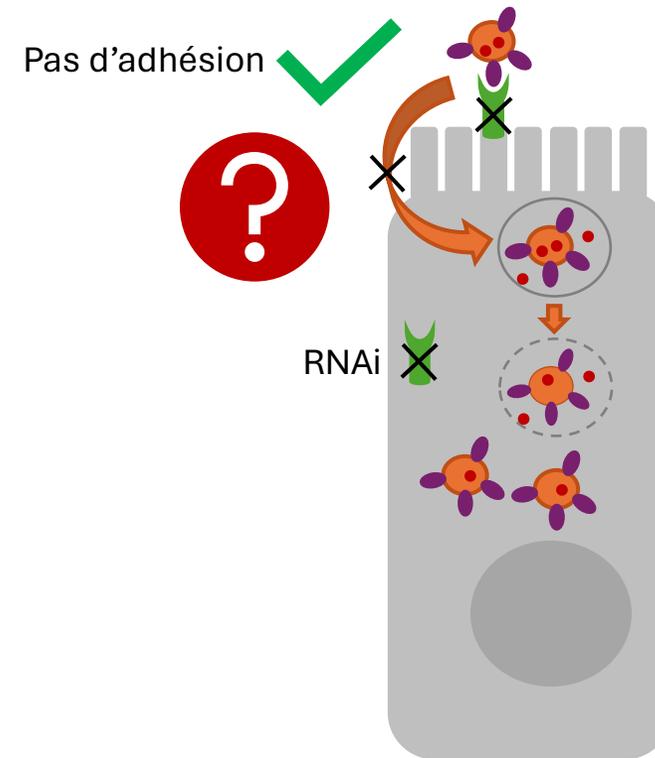


Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

La protéine uk1_LRR de l'insecte semble être un bon candidat pour être un récepteur pour le phytoplasme



Maintenant comprendre comment se passe la pénétration du phytoplasme dans la cellule => focus sur la protéine **clathrine** qui est classiquement impliquée dans les mécanismes d'endocytose



Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion
d'ARNdb par
l'insecte



GFP
dsRNA

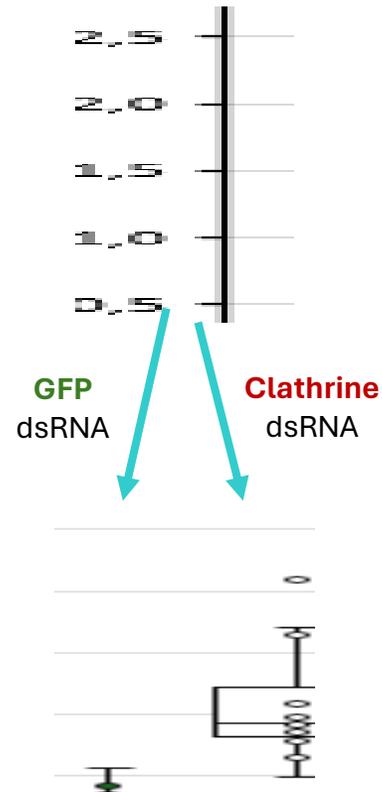
Clathrine
dsRNA



Plantes infectées
par phytoplasme de
la FD

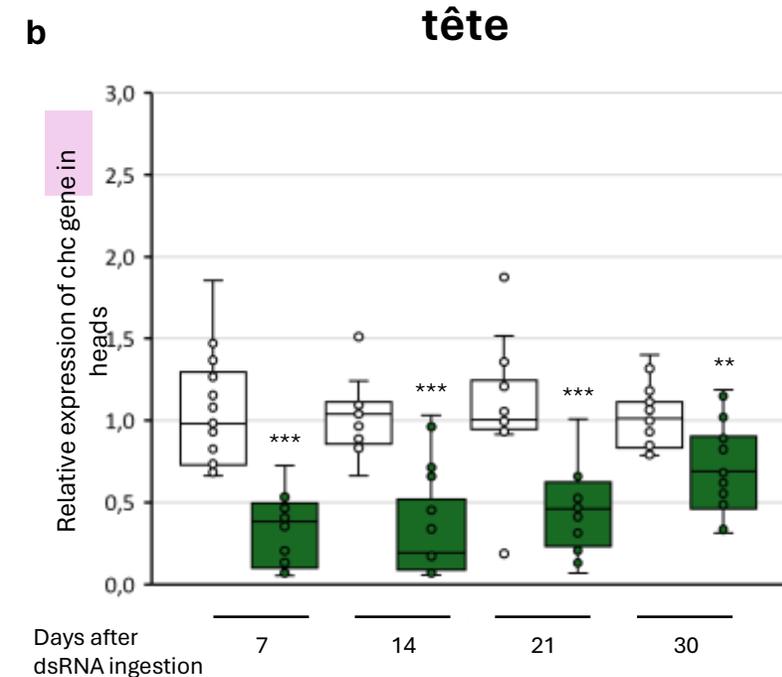
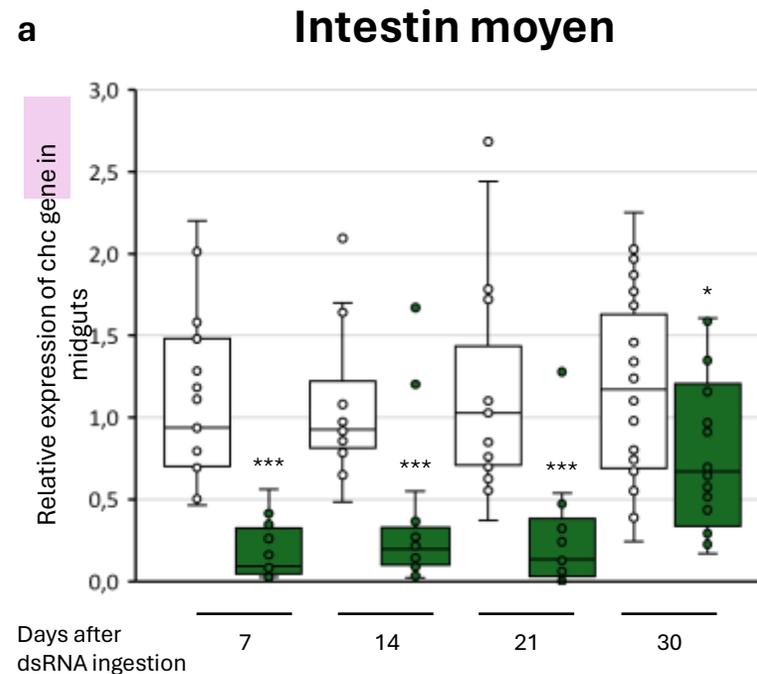
Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion
d'ARNdb par
l'insecte



Plantes infectées
par phytoplasme de
la FD

Moins d'expression du gène codant pour la protéine clathrine pendant au moins 3 semaines
Diminution plus importante dans l'intestin que dans la tête

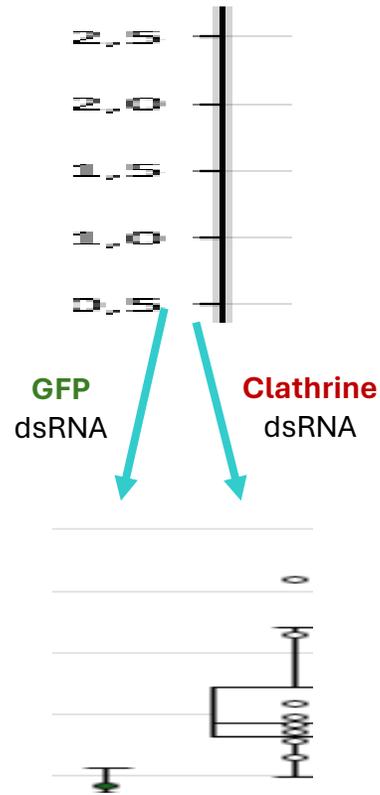


□ GFP dsRNA
■ chc (clathrin heavy chain) dsRNA

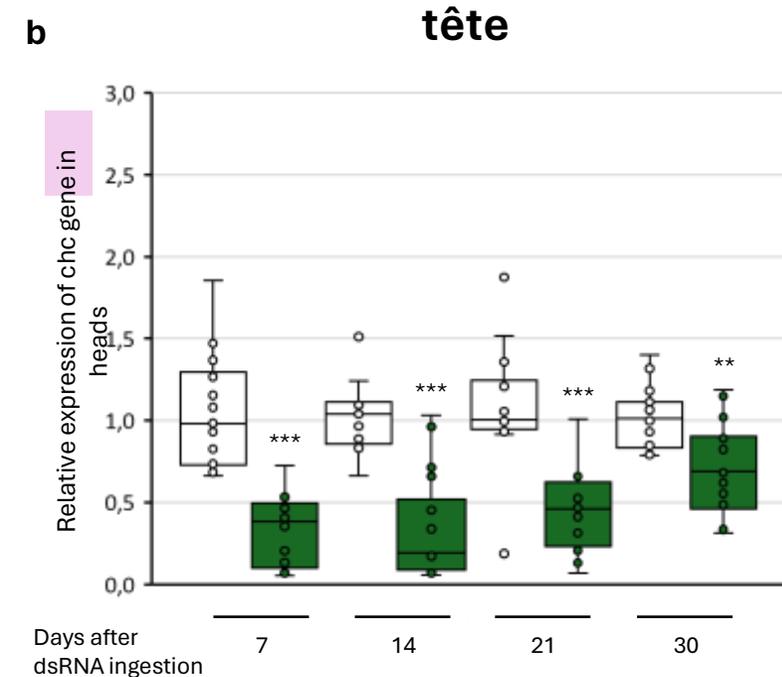
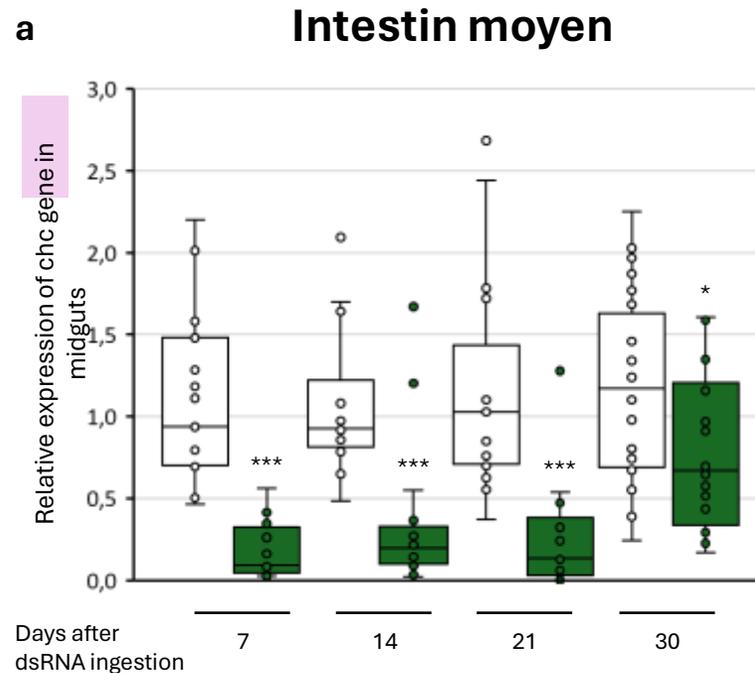
Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion
d'ARNdb par
l'insecte

Moins d'expression du gène codant pour la protéine clathrine pendant au
moins 3 semaines
Diminution plus importante dans l'intestin que dans la tête



Plantes infectées
par phytoplasme de
la FD



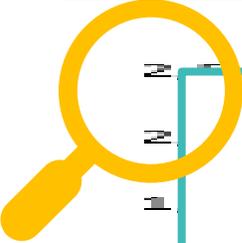
□ GFP dsRNA
■ chc (clathrin heavy chain) dsRNA

✓ L'ingestion d'ARNdb perturbe
l'expression du gène

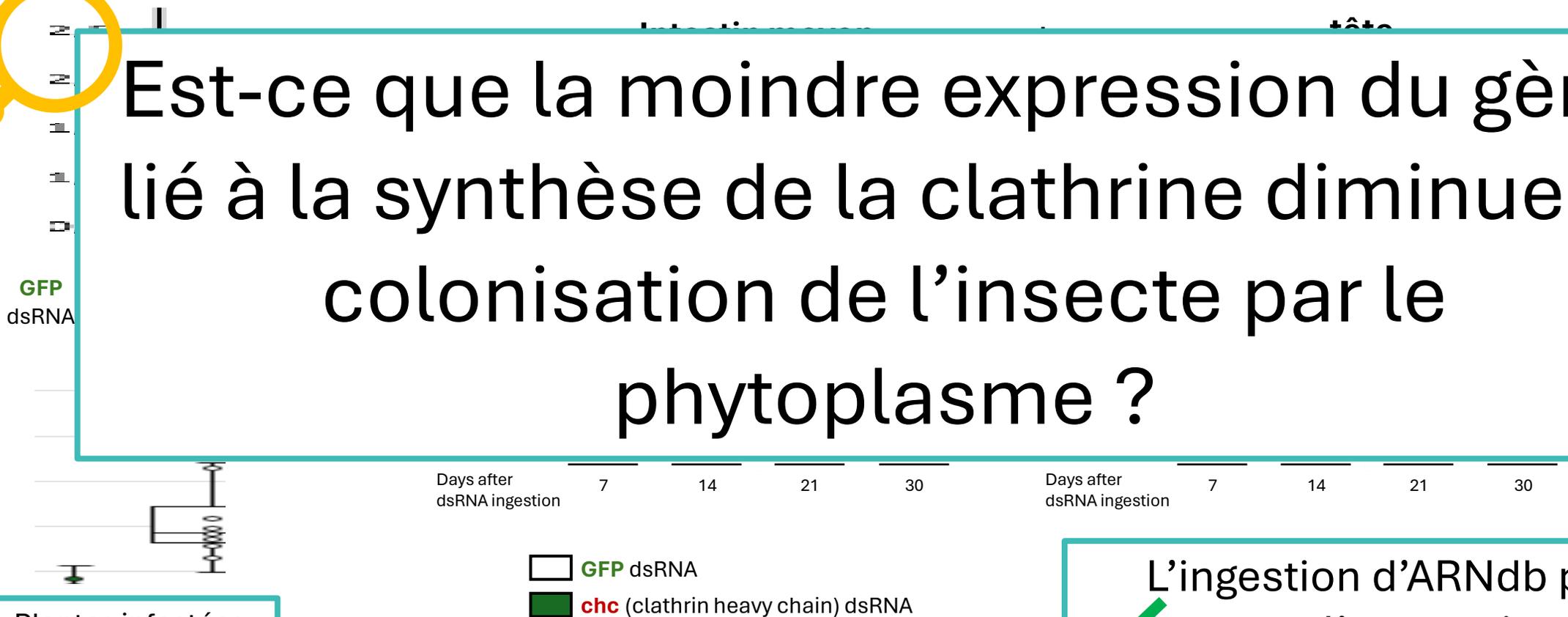
Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion d'ARNdb par l'insecte

Moins d'expression du gène codant pour la protéine clathrine pendant au moins 3 semaines
Diminution plus importante dans l'intestin que dans la tête



Est-ce que la moindre expression du gène lié à la synthèse de la clathrine diminue la colonisation de l'insecte par le phytoplasme ?



Plantes infectées par phytoplasme de la FD

✓ L'ingestion d'ARNdb perturbe l'expression du gène

Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion
d'ARNdb par
l'insecte



GFP
dsRNA

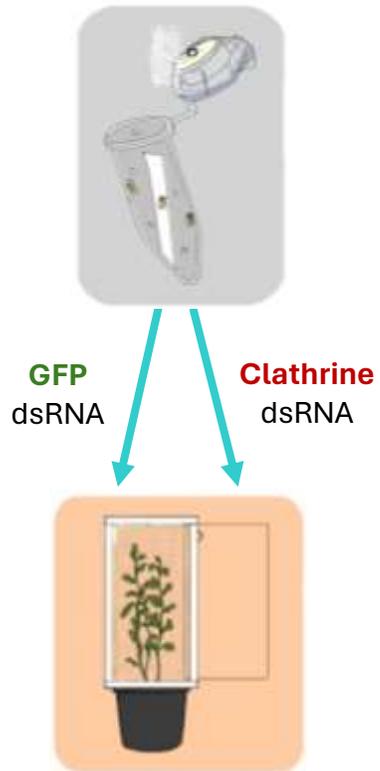
Clathrine
dsRNA



Plantes infectées
par phytoplasme de
la FD

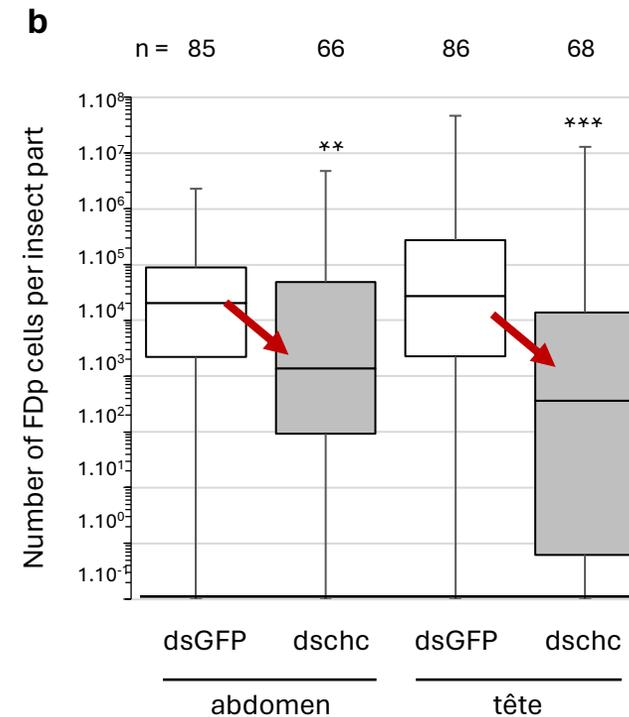
Question : quels sont les mécanismes d'endocytose du phytoplasme de la FD ?

Ingestion
d'ARNdb par
l'insecte



Plantes infectées
par phytoplasme de
la FD

Quantité de phytoplasme FD / partie d'insecte
(tête ou abdomen) (24 dpi)



L'ingestion d'ARNdb clathrine réduit significativement la
quantité de phytoplasme dans la tête et l'abdomen
Résultats très variables suivant les individus

Question : et si *Scaphoideus titanus* ne pouvait plus transmettre le phytoplasme ?



- Identification de 2 mécanismes cellulaires (protéines) impliqués dans la capacité de vexion de la FD :

- **Reconnaissance phytoplasme / cellule**
- **Endocytose du phytoplasme**



- Possibilité de **perturber** ces 2 phénomènes en inhibant la synthèse des protéines impliquées avec la méthode **ARN interférence**



- Etude exploratoire dont l'objectif est surtout de **comprendre. Pas d'application au champ à attendre pour le moment.**

- Pour éventuelle application au champ (hors faisabilité technique) 2 verrous sont à lever :

- Une première étape sera de **valider** quelles molécules ARN entraînent une réduction de la transmission des phytoplasmes en conditions expérimentales.

- Une deuxième étape sera de **vérifier l'efficacité** de la méthode pour inhiber la vexion de la FD par *S. titanus*.



Remerciements

INRAE, Univ. Bordeaux, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, Villenave d'Ornon, France



F. Canuto M-P. Dubrana S. Duret



S. Malembic-Maher X. Foissac N. Arricau-Bouvery

Univ. Bordeaux, Bordeaux Proteome, Bordeaux, France



S. Claverol

Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center, Bordeaux, France



L. Brocard

*...and thanks to **Gaelle Duflot**, for the custom illustrations*



<https://www.gaelleduflot-illustrations.net/>

Projects



A. Petit 



Flado Innov project

X. Foissac 

Financed by



Quelles alternatives ou compléments à la lutte contre *S. titanus* en viticulture biologique ?



**Les rendez-vous
TechniLoire**

25 janvier 2024



INTERLOIRE
Interprofession des Vins du Val de Loire



IFV



SUDVINBIO
Association Interprofessionnelle

Contexte

- Pyrèvert® (= pyrèthre naturel) :
 - Seul produit autorisé en bio pour les traitements obligatoires contre la cicadelle de la FD
 - Homologué depuis 2009
 - Très grande variabilité d'efficacité constatée chez les viticulteurs
 - Plusieurs projets de R&D pour étudier son comportement = priorité pour la filière viti bio !
- Recherche d'alternatives ou de techniques complémentaires à ce produit
 - Efficacité de méthodes ovicides
 - Efficacité de la glu

Projets

- Présentation des travaux mis en place par de 2018 à 2021



- 2018 : essais financés par



- 2019-2021 : essais mis en place dans le cadre du projet RISCA

du **PLAN NATIONAL DÉPÉRISSEMENT DU VIGNOBLE**



Financé par



La responsabilité du ministère chargé de l'agriculture et de FranceAgriMer ne saurait être engagée

Le détail des résultats est accessible sur la page RISCA du site internet du PNDV

<https://www.plan-deperissement-vigne.fr/recherches/programmes-de-recherche/risca>

Evaluation de méthodes de lutte à visée ovicide

Physiques



Application produit

- Huiles minérales
- Di-hydroxyde de calcium
 - Dose
 - Localisation de l'application



Evaluation de méthodes de lutte à visée ovicide

Epampreuse à lanières

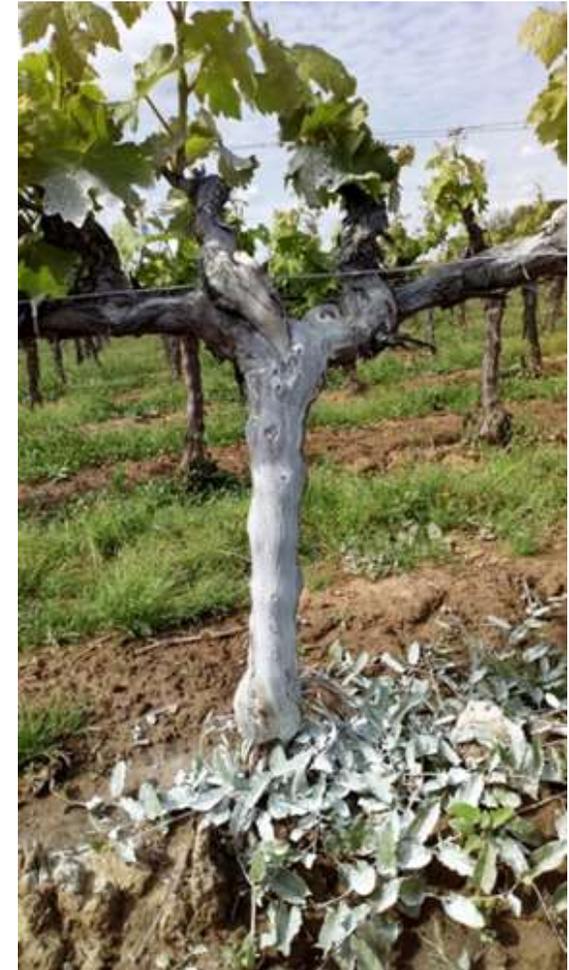


Décapage à l'eau chaude



Evaluation de méthodes de lutte à visée ovicide

Di-hydroxyde de calcium

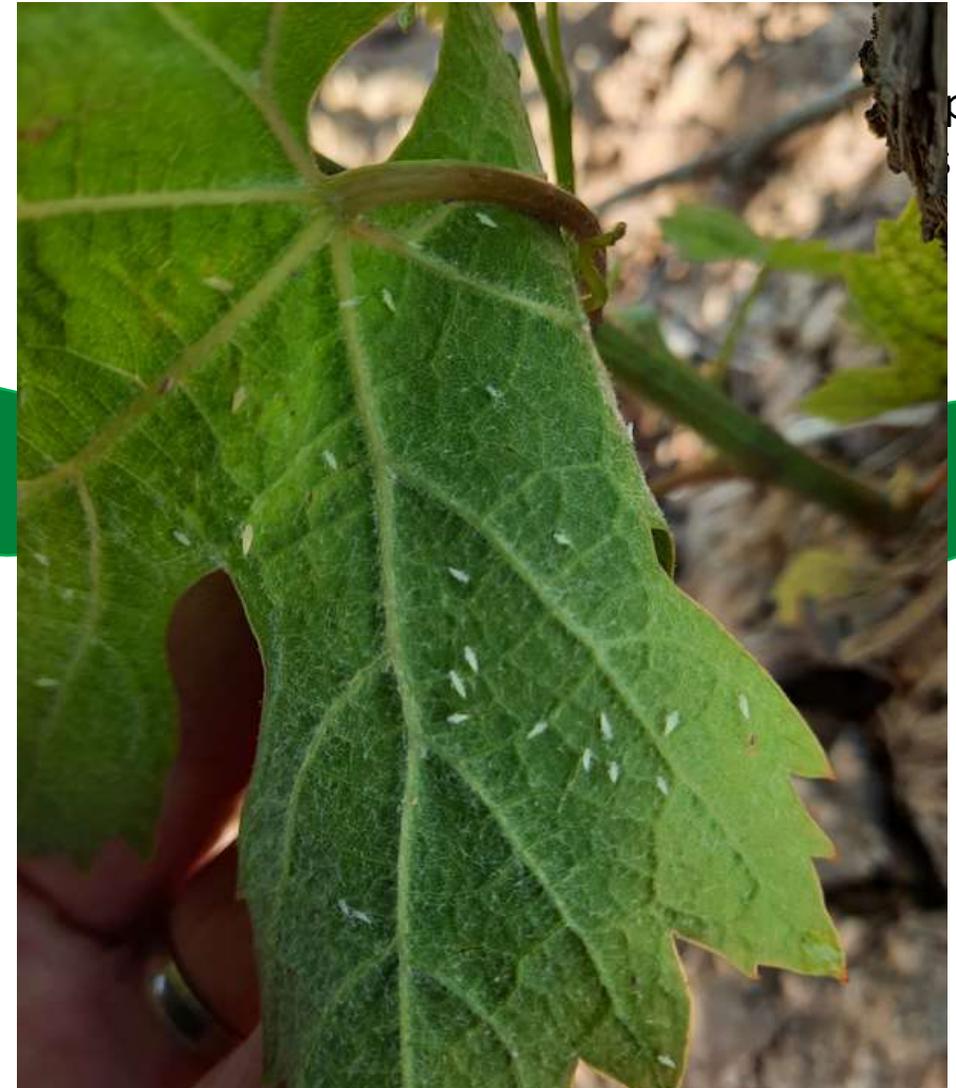


Bilan

	Facilité de mise en œuvre	coût	Efficacité	Commentaires
 <p>Décapage à eau pressurisée</p>				<p>Technique très consommatrice en eau</p> <p>Il n'existe pas de machine adaptée à la vigne</p> <p>Si elle précède l'application de produits ovicides, cette technique peut en augmenter l'efficacité</p>
 <p>Ecorçage mécanique</p>				<p>L'écorçage peut être réalisé à l'aide d'une épampreuse mécanique à lanières</p> <p>Il doit être réalisé le plus haut possible sur le tronc, au plus proche du cordon</p> <p>La difficulté de mise en œuvre dépend beaucoup de la qualité d'implantation des rangs de vigne</p>
 <p>di-hydroxyde de calcium</p>				<p>Attention à la qualité de formulation</p> <p>Les doses de produits apportées sont extrêmement élevées : coût élevé</p>
 <p>Huile minérale</p>				<p>Nécessite un volume de bouillie important, difficile à mettre en œuvre (> 500 l/ha)</p> <p>L'application nécessite le recours aux panneaux récupérateurs</p> <p>Une double application sécurise l'efficacité du traitement</p>

Evaluation d'une barrière physique : la glu

- Localisation des larves hétérogène sur le cep en début de période de TO :
- Chute des larves au sol :
 - Météo : vent, pluie
 - Traitement
- Remontée des larves sur le cep



Exemple de feuille de pampre sur une parcelle à forte population de cicadelle (hors PLO)

Evaluation d'une barrière physique : la glu



Bilan



	Facilité de mise en œuvre	coût	Efficacité	Commentaires
Décapage à eau pressurisée				Technique très consommatrice en eau Il n'existe pas de machine adaptée à la vigne Si elle précède l'application de produits ovicides, cette technique peut en augmenter l'efficacité
Ecorçage mécanique				L'écorçage peut être réalisé à l'aide d'une épampreuse mécanique à lanières Il doit être réalisé le plus haut possible sur le tronc, au plus proche du cordon La difficulté de mise en œuvre dépend beaucoup de la qualité d'implantation des rangs de vigne
di-hydroxyde de calcium				Attention à la qualité de formulation Les doses de produits apportées sont extrêmement élevées : coût élevé
Huile minérale				Nécessite un volume de bouillie important, difficile à mettre en œuvre (> 500 l/ha) L'application nécessite le recours aux panneaux récupérateurs Une double application sécurise l'efficacité du traitement
Glu				Difficulté de pose des bandes engluées, cep par cep. Développement technique indispensable. Dans notre essai, cette technique a été aussi efficace que les traitements au pyrèthre naturel.

Bilan

	Facilité de mise en œuvre	coût	Efficacité	Commentaires
 Décapage à eau pressurisée				Technique très consommatrice en eau Il n'existe pas de machine adaptée à la vigne



Aucune méthode testée, seule ou combinée, ne permet de maîtriser totalement les populations de cicadelles.

 Glu				Une double application sécurise l'efficacité du traitement Difficulté de pose des bandes engluées, cep par cep. Développement technique indispensable. Dans notre essai, cette technique a été aussi efficace que les traitements au pyrèthre naturel.
---	--	--	--	--