

# **UN TRAITEMENT PAR ARN INTERFERENCE POUR LUTTER CONTRE LA FLAVESCENCE DOREE ?**

**FD-RNAi**

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?



Partenaires :  

## UN TRAITEMENT PAR ARN INTERFERENCE POUR LUTTER CONTRE LA FLAVESCENCE DOREE ?

### FD-RNAi

Use of RNA interference against flavescence  
dorée?

« Appel à projet Protection durable des  
cultures sans néonicotinoïdes  
Programme 2017 »  
Rapport final- Juillet\_2019

INRA, Centre de Nouvelle-  
Aquitaine Bordeaux

Arricau-Bouvery Nathalie  
INRA, Centre de Nouvelle-  
Aquitaine Bordeaux,  
Campus de la Grande  
Ferrade, UMR 1332 BFP,  
71 avenue Edouard  
Bourlaux CS20032 33883

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

VILLENAVE D'ORNON  
CEDEX

Date : 26/07/2019

N° de contrat : AFB/2018/188

Date du contrat : 31/07/2018

**Action pilotée par les Ministères chargés du développement durable (MTES), de l'agriculture (MAA), de la santé (MSS) et de la recherche (MESRI), avec l'appui financier de l'Agence Française pour la Biodiversité, par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au financement du Plan Ecophyto**

## Table des matières

Synthèse .....	6
Contexte général .....	8
Objectifs généraux du projet.....	8
Quelques éléments de méthodologie (et éventuelles difficultés rencontrées) .....	8
Résultats obtenus .....	8
Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation.....	8
Partenariats mis en place, projetés, envisagés .....	8
Pour en savoir plus (quelques références).....	8
Liste des opérations de valorisation issues du contrat (articles de valorisation, participations à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises...)	9
Résumés .....	10
Résumé court.....	10
Résumé long .....	10
Mots-clés.....	10
Abstract .....	10
Key words .....	10
Rapport scientifique.....	11
Annexe : textes des publications.....	13
Publications scientifiques parues .....	13
Publications scientifiques à paraître .....	13
Publications scientifiques prévues.....	13
Annexe : partie confidentielle.....	14

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

## **SYNTHESE**

# **Un traitement par interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?**

**Plan Ecophyto II –  
Appel à projet Protection durable des cultures sans  
néonicotinoïdes  
Programme 2017**

**Nathalie Arricau-Bouvery**

## En français

---

### CONTEXTE GENERAL

La flavescence dorée (FD) est une maladie de la vigne due à une bactérie (phytoplasme) transmise par l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*. Le vecteur *Scaphoideus titanus* en lui-même ne cause pas de dégâts à la vigne, contrairement au phytoplasme qu'il transmet (perte de production, mort du cépage). La flavescence dorée est présente dans tout le vignoble du sud de la France, où elle est maintenant installée de façon chronique, et dans le vignoble bourguignon (ainsi que dans de nombreux autres vignobles en Europe). Les phytoplasmes figurent sur la liste des pathogènes de quarantaine et le vecteur *Scaphoideus* est lui aussi un organisme de quarantaine classé dans la liste des organismes de lutte obligatoire. A ce titre, diverses mesures réglementaires de lutte contre la flavescence dorée ont été instaurées, incluant la destruction des plants contaminés et des traitements insecticides obligatoires sur les parcelles atteintes et celles autour des zones contaminées (périmètre de lutte obligatoire, Arrêté de 2003). Le périmètre de lutte obligatoire est passé de 58% du vignoble français en 2013 à 69% en 2015, avec 125% de surface développée traitée en 2013 et 134% en 2015. A l'heure actuelle, les traitements employés contre la cicadelle sont le thiaméthoxame (nicotinoïde) et les pyréthrinoïdes.

Depuis plusieurs années des efforts sont menés conjointement par la profession viticole, les organisations territoriales et nationales pour diminuer ces traitements insecticides en augmentant la prospection des nouveaux cas de flavescence dorée au vignoble et des plantes environnementales hébergeant les phytoplasmes apparentés à ceux de la flavescence dorée. Les recherches récentes, menées notamment dans notre équipe de l'INRA (UMR BFP 1332), ont permis le développement d'outils moléculaires de détection du phytoplasme (identification des plantes infectées et insectes porteurs), de génotypage (suivi des souches pouvant permettre de déterminer leur origine), et d'évaluation du risque épidémique (interaction avec le vecteur *Scaphoideus titanus*) pour réaliser cette prospection. Il en résulte qu'une surveillance fine des souches de phytoplasmes et des insectes, alliée à des traitements insecticides et arrachages de vignes ciblés, permet de contenir la maladie surtout dans les vignobles bordelais et bourguignon. Ceci a conduit à emmener les surfaces en périmètre de lutte obligatoire sans traitement de 2% en 2013 à 8% du vignoble français en 2015. La situation épidémique dans la région Occitanie/Pyrénées-Méditerranée et le manque de prospection (coûteux en moyens humain et financier) induit cependant l'utilisation plus massive de pesticides. De plus, il est à noter que le vecteur *Scaphoideus titanus* est maintenant installé dans le vignoble champenois et alsacien, bien qu'aucune épidémie n'ait encore été observée, ce qui fait courir le risque d'épidémies émergentes à ces deux régions. Si seules les mesures mises en place actuellement sont suivies pour lutter contre la flavescence dorée, la progression des épidémies de cette maladie est prédite dans toute l'Europe par l'EFSA (Rapport de 2016 « Risk to plant health of flavescence dorée for the EU territory, EFSA Journal 14(12) :4603). Plusieurs alternatives sont envisageables à l'utilisation des insecticides : la lutte biologique (utilisation du symbiote *Wolbachia*, des champignons *Paecilomyces fumosoroseus* et *Verticillium lecanii* ou du parasitoïde *Agnagrus atomus*), des moyens de lutte physique contre le vecteur (argiles ou huiles), des approches génétiques (génotypes résistants aux cicadelles ou au phytoplasme de la

flavescence dorée) et agro-écologiques. Cependant leur stade de développement, les difficultés de mise en œuvre ou leur non efficacité au terrain ne permettent pas de les utiliser à l'heure actuelle. Il apparaît clairement que les recherches doivent être poursuivies pour proposer des mesures alternatives durables et soucieuses de l'environnement. L'une de ses alternatives serait d'utiliser la méthode d'ARN interférence sur l'insecte *Scaphoideus titanus* pour bloquer la transmission du phytoplasme par l'insecte ou tuer les cicadelles infectieuses.

La vitesse de propagation de l'épidémie dépend de la charge en phytoplasmes présents dans les pieds de vigne, du niveau des populations d'insectes, et du taux d'infection des insectes. La réduction de la charge en phytoplasmes dans la vigne et l'insecte a pu être observée en champs ou au laboratoire. Pour la plante, il a été montré que les cépages Merlot et Syrah, par exemple, multipliaient moins le phytoplasme de la flavescence dorée que le cépage Cabernet-Sauvignon (1). Pour l'insecte, la capacité de transmettre le phytoplasme de la flavescence dorée est proportionnelle à la quantité de phytoplasmes présents dans son organisme (2). Pour être transmis par leur insecte vecteur, les phytoplasmes contenus dans les tubes criblés du phloème doivent être ingérés en même temps que la sève élaborée, puis pénétrer dans l'organisme de l'insecte par l'intestin moyen, se multiplier dans plusieurs tissus et être expulsés dans la salive puis injectés dans les tubes criblés du phloème de la plante lorsque l'insecte se nourrit (3). Les premières étapes d'adhésion du phytoplasme aux cellules épithéliales intestinales sont essentielles à l'établissement de l'infection de l'insecte. Elles mettent en jeu la protéine VmpA du phytoplasme (4) et une ou plusieurs protéines de l'insecte dont l'identification est en cours au laboratoire BFP1332. Lorsque cette protéine d'insecte et son gène seront connus, l'inhibition de l'expression de ce gène devrait bloquer ou fortement diminuer la transmission du phytoplasme par le vecteur. L'inhibition de l'expression de ce gène sera réalisée par ARN interférence. Cette technique est basée sur la destruction des ARNs messagers dont la séquence est homologue à de petits ARNs double brin qui sont introduits dans l'insecte. Cette technique a déjà été appliquée dans notre laboratoire sur la cicadelle *Circulifer haematoceps* vectrice du phytopathogène *Spiroplasma citri* (5). Un tel traitement ciblerait spécifiquement le vecteur *Scaphoideus titanus* sans affecter le niveau des populations de cet insecte ni les insectes d'autres espèces. Les avantages de l'utilisation de l'ARN interférence sont (i) de s'étendre sur une longue période après une seule administration, (ii) de cibler des gènes impliqués dans la survie de l'insecte ou la transmission du pathogène, et (iii) d'être hautement spécifique de l'espèce d'insecte (6). Cette technique a par exemple été utilisée sur l'aleurode *Bemisia tabaci* et a permis de diminuer la transmission du virus TYLCV (7). Cette technique est aussi adaptable pour réaliser des traitements insecticides en ciblant des gènes létaux (8) ou qui une fois inactivés induiraient une forte diminution de la survie de l'insecte infecté par le phytoplasme.

Notre capacité à inhiber la transmission du phytoplasme de la flavescence dorée est dépendante de nos connaissances des acteurs bactériens et des insectes impliqués dans ce phénomène. La démonstration de la faisabilité de l'inactivation d'un gène de *Scaphoideus titanus* par ARN interférence permettra ainsi de pouvoir utiliser cette technique pour décrypter les mécanismes moléculaires de la transmission du phytoplasme par son insecte vecteur. Nous pourrions alors imaginer utiliser d'autres molécules que l'ARN double brin pour empêcher la transmission de ce phytoplasme. Par exemple, l'étape d'acquisition de la bactérie par l'insecte est particulièrement



Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

importante car elle pourrait être bloquée par des molécules synthétiques ingérées par la cicadelle, ce qui induirait une forte diminution de la transmission des phytoplasmes à la plante comme c'est le cas par exemple avec l'ingestion de petits peptides synthétiques par *Graphocephala atropunctata* qui induit une forte diminution de la transmission de la bactérie vasculaire *Xylella fastidiosa* (9)

## OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Les pyréthrinoïdes sont majoritairement employés en remplacement du thiaméthoxame, mais ont un fort impact sur la faune auxiliaire qui contribue à la réduction des populations de *Scaphoideus titanus*. Des résistances à ces insecticides sont aussi susceptibles d'apparaître avec un risque élevé (Anses, Saisine n° 2016-SA-0057). En agriculture biologique le Pyrevert est utilisé, mais même si sa rémanence est faible, c'est un produit non spécifique de *Scaphoideus titanus*.

L'alternative que nous proposons, empêcher la transmission des phytoplasmes par son insecte vecteur ou la diminution drastique de la survie des insectes infectés, ne pourra pas être applicable avant quelques années. Mais les solutions proposées parce qu'elles ciblent la transmission de la bactérie et non directement les populations de l'insecte vecteur, sont respectueuses de la biodiversité et de l'environnement. Elles sont aussi spécifiques de l'insecte vecteur du phytoplasme de la flavescence dorée et seront aisément adaptables contre des vecteurs émergents, le cas échéant. Les objectifs de ce projet sont de tester et valider la méthodologie d'inactivation de l'expression de gènes de l'insecte vecteur par ARN interférence sur les cicadelles vectrices expérimentale *Euscelidius variegatus* et naturelle *Scaphoideus titanus* du phytoplasme de la flavescence dorée.

## QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

Les essais d'inhibition de gènes par RNAi ont été réalisés sur le vecteur expérimental *Euscelidius variegatus* élevé en serre de confinement S2 et l'insecte vecteur naturel *Scaphoideus titanus* éclos en serre de confinement à partir d'œufs pondus sur bois de vigne et récoltés au terrain en hivers.

Nous avons ciblé un gène spécifique des muscles, car l'inactivation du gène MP20 codant une protéine musculaire chez l'insecte *Diaphorina citri*, vecteur de l'agent du huanglongbing, a induit une augmentation de la mortalité de l'insecte (10). Le gène MP20 n'ayant pas été retrouvé dans la banque EST d'*Euscelidius variegatus*, nous avons testé l'ARN interférence sur le gène MP300, lui aussi spécifique du muscle. Les fragments des gènes MP300 et tubuline ont été amplifiés et séquencés à partir des préparations d'ADN complémentaires des deux insectes. La synthèse des ARN double brin a été réalisée à l'aide du kit MEGAscript RNAi d'Ambion. L'administration des ARNs double brin a été réalisée selon deux méthodes : injection dans l'abdomen de l'insecte ou immersion des cicadelles. La méthode d'injection a été testée sur *E. variegatus* et *S. titanus* en utilisant un injecteur manuel et une solution contenant des ARNs double brin homologues à la séquence du gène à inactiver. Les premiers essais de mises au point ont été réalisés avec le vecteur expérimental *E. variegatus* pour des facilités d'accessibilité à un nombre important d'insectes grâce à notre élevage, puis avec le vecteur naturel *S. titanus* dont le taux de pontes dans les bois de vigne est aléatoire selon les années et les sites.

La méthode d'immersion n'a été testée que sur *E. variegatus* avec une solution contenant divers agents mouillant et du bleu de Méthylène. Les essais n'ont pas été

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

réalisés avec *S. titanus* car cette méthodologie ne nous a pas paru suffisamment efficace pour faire pénétrer des ARNdb dans les insectes.

## RESULTATS OBTENUS

L'injection d'ARN double brin ciblant le gène musculaire MP300 aux cicadelles *E. variegatus* a induit une diminution des transcrits MP300 3 jour après injection des ARNdb. L'effet inhibitrice a été observée jusqu'à 15 jours post-injection. Des résultats similaires montrant une diminution des ARNm jusqu'à 14 jours ont été observés lors de l'injection d'ARNdb ciblant les gènes de l'actine musculaire et de l'ATP synthase beta d'*E. variegatus* (11).

Des tests de RNAi ont été réalisés pour la première fois sur *Scaphoideus titanus*. L'injection d'ARNdb a induit une diminution de l'expression du gène MP300 jusqu'à 14 jours. La réponse est beaucoup plus variable dans le temps comparativement à *E. variegatus*, mais cela pourrait s'expliquer par le fait qu'un seul essai a pu être réalisé à cause de la plus grande difficulté d'obtention des insectes en nombre suffisant. Des expérimentations seront renouvelées pour confirmer ces résultats. Nous avons donc démontré la faisabilité d'inactiver des gènes chez l'insecte vecteur *S. titanus* lorsque les ARNdb étaient injectés dans l'abdomen.

Nous allons pouvoir utiliser cette technique pour décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission du phytoplasme, à savoir les molécules mises en jeu lors du cycle du phytoplasme dans l'insecte lui permettant d'être acquis à partir d'une plante malade puis d'être injecté à une plante saine. Nous avons débuté en utilisant le RNAi sur les gènes codant la clathrine (*E. variegatus*), l'AP2 (*E. variegatus*) et l'AP1 (*S. titanus*) possiblement impliqués dans l'invasion des cellules d'insecte par le phytoplasme de la FD. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec le gène MP300 et vont nous permettre de tester l'effet du RNAi dirigé contre ces gènes sur la transmission des phytoplasmes.

L'injection d'ARNdb n'étant pas réalisable pour des applications au terrain, nous avons testé l'apport des ARNdb par contact des insectes avec une solution aqueuse. Les premiers tests ont montré que les insectes ne s'immergeaient pas dans de l'eau. Les tests d'immersion suivants ont été réalisés avec des solutions contenant des agents mouillant (CTAB, SDS, Tween 20, Triton X100 et Silwet L77) et du bleu de Méthylène. Dans ces conditions, les insectes ont pu être immergés dans une goutte de solution. Cependant, seule la cuticule a été colorée en bleu dans les conditions de concentration les plus élevées. Aussi nous avons préféré ne pas utiliser cette méthode pour délivrer des ARNdb dans l'organisme des insectes et avons commencé des études de délivrance des ARNdb par voie orale, une méthode d'application efficace sur insectes (12-15).

## IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

L'inhibition de l'expression des gènes MP300, clathrine et AP2b chez *Euscelidius variegatus* (insecte vecteur expérimental) et des gènes MP300 et AP1b chez *Scaphoideus titanus* (insecte vecteur naturel) va nous permettre d'étudier les gènes de l'insecte potentiellement impliqués dans la transmission du phytoplasme de la flavescence dorée.

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

- Recommandations et limites éventuelles :

La technique du RNAi appliquée sur *Scaphoideus titanus* pourrait être utilisée pour empêcher les épidémies de flavescence dorée soit en inhibant la transmission du phytoplasme par *S. titanus* soit en diminuant le taux de survie des insectes infectés. Deux problèmes majeurs restent à être résolus : le mode de délivrance des ARNdb compatible avec une application au terrain et l'innocuité vis-à-vis des insectes partageant la niche écologique de *S. titanus*.

- Réalisations pratiques et valorisation :

Ces résultats seront complétés par des répétitions d'expérimentations, puis publiés et communiqués à la communauté scientifique.

### **PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES**

Pas de partenariat envisagé directement sur ce projet, mais des discussions sont en cours avec l'équipe de Cristina Marzachi (CNR Turin) sur le décryptage de la transmission des phytoplasmes de la flavescence dorée et l'utilisation de l'ARN interférence pour bloquer la transmission.

### **POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)**

1. Eveillard S, Jollard C, Labroussaa F, Khalil D, Perrin M, Desqué D, Salar P, Razan F, Hévin C, Bordenave L, Foissac X, Masson JE, Malembic-Maher S. 2016. Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild Vitis Species. *Plant Biot Interact* 1762.
2. Bressan A, Clair D, Semetey O, Boudon-Padieu E. 2006. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of flavescence Doree phytoplasma. *Phytopathology* 96:790–796.
3. Hogenhout SA, Oshima K, Ammar E-D, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 9:403–423.
4. Arricau-Bouvery, N., Duret, S., Dubrana, M.-P., Batailler, B., Desqué, D., Béven, L., et al. (2018) Variable Membrane Protein A of Flavescence Dorée Phytoplasma Binds the Midgut Perimicrovillar Membrane of *Euscelidius variegatus* and Promotes Adhesion to Its Epithelial Cells. *Appl Env Microbiol* 84: e02487-17.
5. Eliautout R, Dubrana M-P, Vincent-Monégat C, Vallier A, Braquart-Varnier C, Poirié M, Saillard C, Heddi A, Arricau-Bouvery N. 2016. Immune response and survival of *Circulifer haematoceps* to *Spiroplasma citri* infection requires expression of the gene hexamerin. *Dev Comp Immunol* 54:7–19.
6. Kim YH, Soumaila Issa M, Cooper AMW, Zhu KY. 2015. RNA interference: Applications and advances in insect toxicology and insect pest management. *Pestic Biochem Physiol* 120:109–117.
7. Pan L-L, Chen Q-F, Zhao J-J, Guo T, Wang X-W, Hariton-Shalev A, Czosnek H, Liu S-S. 2017. Clathrin-mediated endocytosis is involved in Tomato yellow leaf curl virus transport across the midgut barrier of its whitefly vector. *Virology* 502:152–159.
8. Yu X-D, Liu Z-C, Huang S-L, Chen Z-Q, Sun Y-W, Duan P-F, Ma Y-Z, Xia L-Q. 2016. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Manag Sci* 72:1090–1098.
9. Labroussaa F, Zeilinger AR, Almeida RPP. 2016. Blocking the Transmission of a Noncirculative Vector-Borne Plant Pathogenic Bacterium. *Mol Plant Microbe Interact* 29:535–544.
10. Yu X, Gowda S, Killiny N. 2017. Double-stranded RNA delivery through soaking mediates silencing of the muscle protein 20 and increases mortality to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Manag Sci*.
11. Abbà, S., Galetto, L., Ripamonti, M., Rossi, M., and Marzachi, C. (2019) RNA interference of muscle actin and ATP synthase beta increases mortality of the phytoplasma vector *Euscelidius variegatus*. *Pest Manag Sci* 75: 1425–1434.

## Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

12. Coleman, A.D., Wouters, R.H.M., Mugford, S.T., and Hogenhout, S.A. (2015) Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J Exp Bot* 66: 541–548.
13. Li, H., Guan, R., Guo, H., and Miao, X. (2015) New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ* 38: 2277–2285.
14. Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., et al. (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants* 3: 16207.
15. Mulot, M., Monsion, B., Boissinot, S., Rastegar, M., Meyer, S., Bochet, N., and Brault, V. (2018) Transmission of Turnip yellows virus by *Myzus persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein. *Front Microbiol* 9: 457.

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

**LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)**

<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	
Publications scientifiques parues	
Publications scientifiques à paraître	
Publications scientifiques prévues	RNA interference of muscle protein MP300 and clathrin of the flavescence dorée phytoplasma vector <i>Scaphoiseus titanus</i>
<b>COLLOQUES</b>	
Participations passées à des colloques	
Participations futures à des colloques	4th International Phytoplasmologist Working Group Meeting (September 2019)
<b>THESES</b>	
Thèses passées	
Thèses en cours	
<b>ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION</b>	
Articles de valorisation parus	
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
<b>AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS</b>	
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	
Actions vers les médias prévues	
<b>ENSEIGNEMENT - FORMATION</b>	
Enseignements/formations dispensés	
Enseignements/formations prévus	
<b>EXPERTISES</b>	
Expertises menées	
Expertises en cours	
Expertises prévues	
<b>METHODOLOGIES (GUIDES...)</b>	
Méthodologies produites	
Méthodologies en cours d'élaboration	
Méthodologies prévues	
<b>AUTRES</b>	
Précisez...	

# RÉSUMÉS

En français

---

## RÉSUMÉ COURT

Des solutions ou traitements alternatifs aux insecticides nécessaires pour lutter contre la flavescence dorée ne sont pas encore disponibles. L'ARN interférence, que nous avons testé dans ce projet, pourrait être employée et serait un atout majeur dans l'avancée des connaissances de la transmission du phytoplasme par *Scaphoideus* pour imaginer d'autres moyens de blocage de la transmission de ces bactéries.

## RESUME LONG

### Contexte

La flavescence dorée est une maladie de quarantaine de la vigne dont l'agent causal est une petite bactérie du genre « *Candidatus Phytoplasma* ». Elle est transmise de vigne à vigne par la cicadelle *Scaphoideus titanus*. Aucun traitement curatif n'est disponible à l'heure actuelle et la lutte contre la flavescence dorée est dirigée contre l'insecte vecteur avec des traitements insecticides et nécessite l'arrachage des plans contaminés. Dans le but de diminuer, voir remplacer, ces traitements, nous proposons d'évaluer une nouvelle méthodologie : l'interférence par ARN contre l'insecte vecteur.

### Objectifs

La transmission des phytoplasmes par son insecte vecteur fait intervenir à la fois des protéines de la bactérie et de l'insecte. Nous faisons l'hypothèse que l'inhibition de la synthèse de protéines cibles de l'insecte pourrait diminuer ou inhiber la transmission des phytoplasmes à la plante. Les objectifs de ce projet sont de tester et valider la méthodologie d'inactivation de l'expression de gènes de l'insecte vecteur par ARN interférence sur la cicadelle *Scaphoideus titanus* vectrice du phytoplasme de la flavescence dorée.

### Méthodologie

Des ARN double brins (ARNdb) ciblant un gène d'intérêt, le gène musculaire MP300, ont été administrés par injection et les ARN messagers ont été quantifiés pour évaluer l'inhibition de l'expression du gène MP300. Cette technique de RNAi a été mise au point sur l'insecte vecteur expérimental *Euscelidius variegatus* puis appliquée à l'insecte vecteur naturel *Scaphoideus titanus*. Le trempage des insectes (stade adulte et larvaire) a été testé avec une coloration au bleu de Méthylène. Si l'injection d'une solution aux insectes est au point au laboratoire, la pénétration de solutés à travers la cuticule de l'insecte n'avait pas encore été testée au laboratoire.

### Principaux résultats obtenus

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

Une inhibition de l'expression du gène MP300 a été obtenue chez la cicadelle vectrice expérimentale *Euscelidius variegatus* adulte pour les temps 3 à 15 jours après injection d'ARNdb ciblant le gène MP300. Des amorces dégénérées ont été commandées pour amplifier et séquencer le gène MP300 de *Scaphoideus titanus*. L'inhibition de l'expression du gène MP300 a aussi été observée aux temps 6 jours et 15 jours post-injection des ARNdb.

Des tests de coloration au bleu de Méthylène par immersion d'*E. variegatus* dans des solutions contenant divers détergents (CTAB, SDS, Tween 20, Triton X100 et Silwet L77) n'a pas permis de montrer que les tissus internes des insectes étaient colorés. De ce fait, les essais d'inhibition par immersion des insectes dans une solution contenant ces détergents et les ARNdb n'ont pas été mis en place.

### **Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles**

Ce projet n'a pas produit directement de sortie opérationnelle ni d'application. Les études de la transmission du phytoplasme de la flavescence dorée par son insecte vecteur se poursuivent dans le projet RISCA : plan de lutte contre la flavescence dorée : générer des connaissances nouvelles pour un meilleur pilotage, porté par Audrey Petit (Institut Français de la vigne et du vin) et financé par le Plan national déperissement du vignoble (2019-2021). Les résultats obtenus dans ce projet RISCA nous permettront d'obtenir des cibles de l'insecte contre lesquelles le RNAi pourra être appliqué soit pour bloquer la transmission des phytoplasmes soit pour rendre les insectes plus sensibles à une infection par les phytoplasmes.

### **Recommandations**

Deux problèmes majeurs à l'utilisation du RNAi dans la lutte contre la transmission du phytoplasme de la flavescence dorée par son insecte vecteur *Scaphoideus titanus* restent à être résolus : le mode de délivrance des ARNdb compatible avec une application au terrain et l'innocuité vis-à-vis des insectes partageant la niche écologique de *S. titanus*.

### **MOTS-CLES**

Flavescence dorée; transmission par insecte vecteur ; néonicotinoïde (thiaméthoxane) ; pyréthrinoïdes ; ARN interférence

### **In English**

---

### **ABSTRACT**

#### **Context**

Flavescence dorée is a quarantine disease of grapevine caused by a small bacterium of the genus "*Candidatus Phytoplasma*". It is transmitted from grapevine to grapevine by the leafhopper *Scaphoideus titanus*. No curative treatment is available by the hour and the fight against flavescence dorée is directed against the insect vector using insecticide treatments and requires the uprooting of contaminated plants. In order to reduce or replace these treatments, we propose to evaluate a new methodology: RNA interference against the insect vector.

## Objectives

The transmission of phytoplasmas by its insect vector involves both proteins of the bacteria and the insect. We hypothesize that inhibition of insect target protein synthesis may decrease or inhibit phytoplasma transmission to the plant. The objectives of this project are to test and validate the methodology of inactivation of the expression of the insect vector genes by RNA interference on the *Scaphoideus titanus* leafhopper vector of the flavescence dorée phytoplasmas.

## Methodology

Double stranded RNAs (dsRNA) targeting a gene of interest, the MP300 muscle gene, were administered by injection and the messenger RNAs were quantified to evaluate the inhibition of the expression of the MP300 gene. This RNAi technique was developed on the experimental insect vector *Euscelidius variegatus* and applied to the insect vector *Scaphoideus titanus*. The soaking of the insects (adult and larval stage) was tested with the staining methylene blue. If the injection of an insect solution is perfected in the laboratory, penetration of solutes through the cuticle of the insect had not yet been tested in the laboratory.

## Main results

An inhibition of the expression of the MP300 gene was obtained in the experimental vector *Euscelidius variegatus* for 3 to 15 days after injection of dsRNA targeting the MP300 gene. Degenerate primers were ordered to amplify and sequence the *Scaphoideus titanus* MP300 gene. Inhibition of the expression of the MP300 gene was also observed at times 6 days and 15 days post-injection dsRNA.

Methylene blue staining tests by immersion of *E. variegatus* in solutions containing various detergents (CTAB, SDS, Tween 20, Triton X100 and Silwet L77) did not show that the internal tissues of the insects were coloured. As a result, insect immersion inhibition tests in a solution containing these detergents and dsRNAs have not been implemented.

## Applications for public policies

This project did not directly produce an operational output or an application. Studies of the transmission of the phytoplasma of flavescence dorée by its insect vector continue in the project RISCA: plan to fight against flavescence dorée: to generate new knowledge for a better piloting, carried by Audrey Petit (French Institute of the vine and of wine) and financed by the National Vineyard Decay Plan (2019-2021). The results obtained in this project RISCA will allow us to obtain targets of the insect against which the RNAi can be applied either to block the transmission of phytoplasmas or to make insects sensitive to phytoplasma infection.

## Recommendations

Two major problems with the use of RNAi in the fight against the transmission of flavescence dorée phytoplasma by its insect vector *Scaphoideus titanus* remain to



Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

be solved: the mode of delivery of dsRNAs compatible with a field application and the safety of insects sharing the ecological niche of *S. titanus*.

**KEY WORDS**

Flavescence dorée; transmission by insect vector; néonicotinoïde (thiaméthoxane); pyréthrinoïdes; RNA interference

## **RAPPORT SCIENTIFIQUE**

# **UN TRAITEMENT PAR ARN INTERFERENCE POUR LUTTER CONTRE LA FLAVESCENCE DOREE ?**

### **FD-RNAi**

**Plan Ecophyto II –  
Appel à projet Protection durable des cultures sans  
néonicotinoïdes  
Programme 2017**

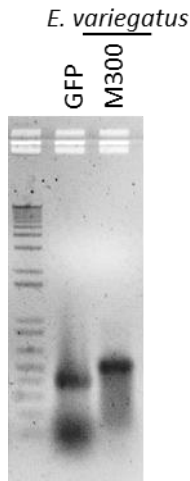
**Nom du responsable scientifique du projet  
Noms des autres partenaires scientifiques bénéficiaires**

## Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

La flavescence dorée est une maladie de la vigne due à une bactérie (phytoplasme) transmise par l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*. Cette maladie présente dans les vignobles Bordelais, Bourguignon et du sud-est de la France ne dispose pas de traitement curatif, et aucun cépage actuellement cultivé n'est totalement résistant. Les méthodes de lutte réglementaires se concentrent en particulier sur l'éradication des plantes contaminées et le ciblage de l'insecte vecteur par des traitements insecticides obligatoires. Les produits phytosanitaires employés contre cette cicadelle sont des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes. Mais en plus de leur coût économique, l'impact de tels traitements sur l'environnement et sur la santé humaine n'est plus à démontrer. Afin de réduire ces traitements, des efforts portant sur la surveillance épidémiologique ont été réalisés, ce qui a permis de diminuer le nombre d'applications des produits insecticides dans les principales régions touchées. Cependant, dans un contexte où les surfaces traitées augmentent avec la progression de la maladie, l'Anses (Saisine n°2016-SA-0057) souligne la nécessité de conduire des recherches en faveur du développement de nouveaux outils et nouvelles approches. Nous avons proposé dans ce projet prospectif d'un an de tester la faisabilité d'utiliser l'ARN interférence pour inhiber un gène du vecteur *Scaphoideus titanus* en laboratoire dans le but de lutter contre la transmission de l'agent pathogène et/ou d'augmenter la mortalité des insectes infectés. Cette technique implique l'administration d'ARNs double brins (ARNdb) qui, traités par la machinerie cellulaire, induiront l'inactivation du gène dont la séquence est homologue à cet ARNdb. En ciblant des gènes impliqués dans la transmission du phytoplasme ou dans la survie des insectes infectés, un traitement à l'aide d'ARNdb pourrait cibler spécifiquement *Scaphoideus titanus*, sans effet nocif notable espéré sur les autres espèces d'insectes. Outre ces applications potentielles, le développement de cette technique permettra d'obtenir un outil indispensable à la compréhension des mécanismes de transmission du phytoplasme par son insecte vecteur.

Le gène choisi pour tester la méthode d'interférence par ARN (RNAi) a été le gène dont la séquence est homologue au gène musculaire MSP-300 de *Drosophila melanogaster*. Des amorces contenant le promoteur et l'ARN polymérase T7 ont été choisies sur une séquence de 752 nucléotides (EST d'*E. variegatus*) pour permettre l'amplification d'un fragment de 441 n. Les ARNdb ont été synthétisés à l'aide du kit HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB), traités à la DNase puis purifiés avant d'être utilisés (Figure 1). Comme témoin, des ARNdb de 323 pb ont été synthétisés avec la même méthodologie à partir du gène codant la GFP.

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?



**Figure 1.** Migration de 1  $\mu$ L d'ARNdb MP300 et GFP (0.04  $\mu$ g/ $\mu$ L) sur gel d'agarose à 1.5%. La colonne de gauche correspond au marqueur moléculaire 1 Kb Plus DNA Ladder.

Un autre couple d'amorces a été sélectionné sur le fragment de 752 pb du gène MP300 en dehors de la séquence amplifiée pour synthétiser l'ARNdb. Ces amorces ont servi à quantifier les ARNs messagers par PCR quantitative en temps réel (amplicon de 198 pb). Le gène de ménage choisi a été le gène de la tubuline beta dont l'expression n'était pas variable dans nos conditions. La méthode de calcul appliquée pour mesurer la diminution du nombre de transcrits est  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ARNdb cible}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ANRdb GFP}}$ .

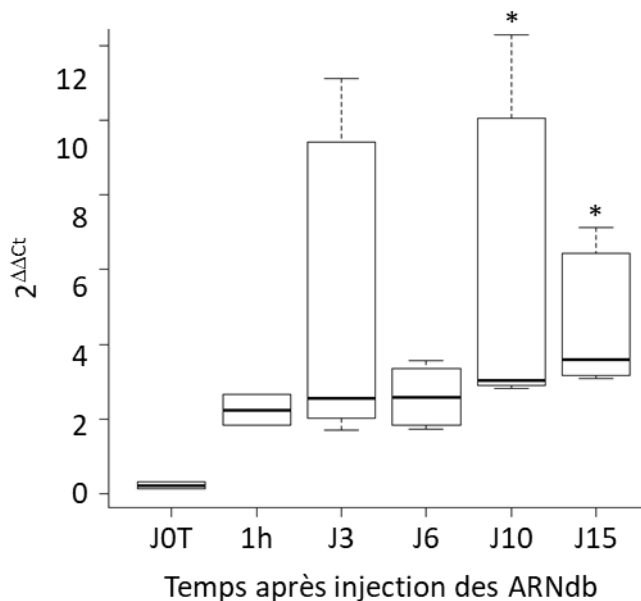
## **Tâche 1. ARN interférence par injection**

### **Tâche 1.1. Inactivation du gène MP300 par injection d'ARN double brins à l'insecte vecteur *Euscelidius variegatus***

Des insectes *E. variegatus* adultes ont été injectés avec une solution à 2  $\mu$ g/ $\mu$ L d'ARNdb MP300 ou GFP, puis mis en latence sur fève en serre de confinement S2. Lors de l'injection manuelle, environ 0.1  $\mu$ L sont injectés aux insectes. Les tests d'inhibition de l'expression du gène MP300 ont été réalisés jusqu'à 15 jours post-injection (pi).

Le taux de survie des insectes suite à une injection de double brin a été mesurée 5 jours pi. Les résultats montrent que la survie des insectes est moins importante lorsque les insectes ont été injectés avec des ARNdb ciblant le gène MP300 (50% de vivants) qu'avec des ARNdb témoins ciblant le gène *gfp* (70% de vivants).

Les résultats d'inhibition de l'expression du gène MP300 par RNAi montrent qu'une réaction est visible dès 3 jours post-injection (figure 2). Une grande variabilité de réponse à l'injection d'ARNdb MP300 a été observée chez les insectes mais les résultats montrent qu'une inhibition de l'expression du gène MP300 est durable et augmente au moins jusqu'à 15 jours post injection. Des résultats similaires montrant une diminution des ARNm jusqu'à 14 jours ont été observés lors de l'injection d'ARNdb ciblant les gènes de l'actine musculaire et de l'ATP synthase beta d'*E. variegatus* (Abbà *et al.*, 2019).



**Figure 2.** Inhibition de l'expression du gène MP300 chez *Euscelidius variegatus* calculée avec la formule  $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{cible}} - C_{t_{m\acute{e}nage(tubuline)})_{Inject\acute{e} \ ARNdb \ cible} - (C_{t_{cible}} - C_{t_{m\acute{e}nage(tubuline)})_{Inject\acute{e} \ ARNdb \ GFP}$ . Le temps J0T correspond aux insectes t\^emoins non inject\^es ; le temps 1h correspond au temps n\^ecessaire \^a l'injection de l'ensemble des insectes ; les insectes ont ensuite \^ete mis en latence sur des f\^eves et pr\^elev\^es 3 \^a 15 jours (J3 \^a J15) apr\^es injection. \*,  $P < 0.05$  avec le test statistique non param\^etrique de Kruskal-Wallis en comparaison avec le temps J0 des insectes inject\^es (temps 1h).

L'efficacit\^e de l'inhibition de g\^enes pouvant varier d'un g\^ene \^a l'autre chez une m\^eme esp\^ece d'insecte, nous avons commenc\^e l'\^etude de l'inhibition de l'expression des g\^enes codant la clathrine (cha\^ene lourde) et la prot\^eine adaptatrice AP2 (sous-unit\^e beta) probablement impliqu\^es dans la transmission des phytoplasmes (r\^esultats non publi\^es). Les ARNdb synth\^etis\^es ont une taille de 416 pb pour le g\^ene AP2 $\beta$  et 426 pb pour le g\^ene clathrine. Les ARNdb ont \^ete utilis\^es \^a la m\^eme concentration (2  $\mu\text{g/mL}$ ) lors des injections des insectes. Des amorces permettant d'amplifier des fragments de 268 pb (AP2 $\beta$ ) et 251 pb (clathrine) ont \^ete s\^electionn\^ees comme pr\^ecedemment pour permettre la quantification des transcrits. Les premiers r\^esultats sont comparables \^a ceux obtenus avec le g\^ene MP300. Les  $2^{\Delta\Delta C_t}$  augmentent de 6.5 ( $\text{\textcircled{f}}$ ) et 1.4 ( $\text{\textcircled{m}}$ ) (1 jour pi) \^a 8.9 ( $\text{\textcircled{f}}$ ) et 6.7 ( $\text{\textcircled{m}}$ ) 10 jours pi pour le g\^ene AP2 $\beta$ , et de 22.4 ( $\text{\textcircled{f}}$ ) et 1.6 ( $\text{\textcircled{m}}$ ) (1 jour pi) \^a 31.9 ( $\text{\textcircled{f}}$ ) et 16.6 ( $\text{\textcircled{m}}$ ) 6 jours pi pour le g\^ene clathrine. Les taux de survie des insectes inject\^es avec les ARNdb clathrine (92% de vivants 5 jpi et 49% de vivants 10 jpi) et AP2b (69% de vivants 5 jpi et 60% de vivants 10 jpi) \^etaient similaires \^a ceux des insectes inject\^es avec les ARNdb GFP (69% de vivants 5 jpi et 60% de vivants 10 jpi).

Ces r\^esultats prometteurs nous permettront d'\^etudier le r\^ole de g\^enes d'insecte impliqu\^es dans la transmission des phytoplasmes par leur insecte vecteur et de d\^efinir des cibles pour \^elaborer des strat\^egies de blocage de cette transmission. Ces travaux sont en cours dans le cadre du projet RISCA : plan de lutte contre la flavescence

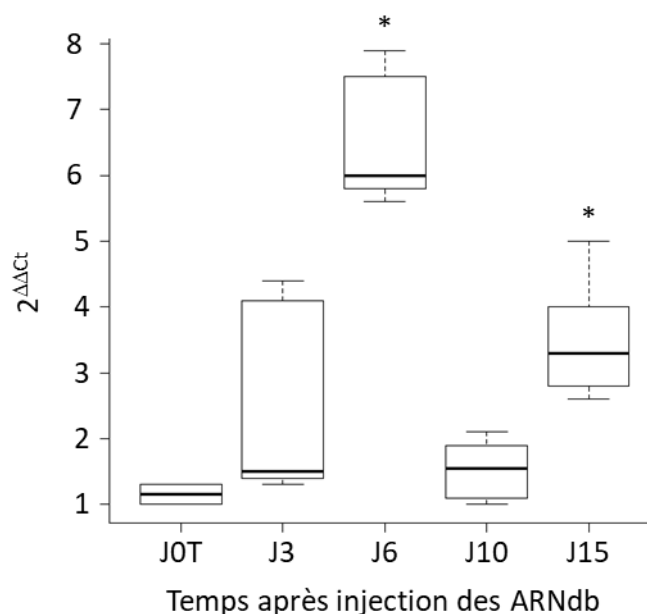
dorée : générer des connaissances nouvelles pour un meilleur pilotage, porté par Audrey Petit (Institut Français de la vigne et du vin) et financé par le Plan national dépérissement du vignoble (2019-2021). Les premiers résultats d'interaction entre l'adhésine VmpA du phytoplasme de la FD et les protéines de l'insecte *E. variegatus* suggèrent que la clathrine et l'AP2 pourraient être impliquées dans l'entrée des phytoplasmes dans les cellules d'insecte. Deux premières expérimentations de l'effet de l'inhibition du gène codant la clathrine par RNAi sur la transmission du phytoplasme sont en cours au laboratoire dans laquelle les insectes ont été infectés par injection de phytoplasmes 3 jours après l'injection des ARNdb. Les premiers résultats montrent que seuls 2.5% des *E. variegatus* (3/80 et 1/80) ont survécu 3 semaines à l'injection d'ARNdb ciblant le gène de la clathrine suivie par l'injection des phytoplasmes. Le pourcentage des insectes vivants injectés avec des ARNdb ciblant le gène de la GFP est de 50% (45/80 et 35/80) et est comparable à celui des insectes témoins non injectés avec des ARNdb (49%, 31/60 et 28/60). La très haute mortalité des insectes injectés avec les ARNdb clathrine ne nous permettra pas de montrer si le gène de la clathrine est impliquée dans la transmission des phytoplasmes, mais les résultats montrent que les insectes injectés avec les ARNdb clathrine sont plus sensibles à l'infection par les phytoplasmes que les insectes témoins. Ces expérimentations vont être renouvelées et analysée à des temps plus précoces pour mesurer la multiplication des phytoplasmes et la survie des insectes.

#### Tâche 1.2. Inactivation du gène MP300 par injection d'ARNs double brins à l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*

Afin de connaître la séquence des gènes codant la protéine musculaire MP300, la tubuline alpha et beta, la clathrine et les protéines adaptatrices AP1b et AP2b, des amorces dégénérées ont été sélectionnées d'après l'alignement de séquences de gènes de plusieurs insectes Hémiptères. Les parties amplifiées des gènes MP300, tubuline beta et AP1b de *S. titanus* ont été séquencées. Des amorces ont été sélectionnées comme précédemment pour la synthèse d'ARNdb et la quantification des transcrits. Les ARNdb MP300 ont une taille de 538 pb, le fragment amplifié pour la PCRq MP300 une longueur de 246 pb et le fragment amplifié pour la PCRq Tub beta une longueur de 217 pb.

Une expérimentation d'inhibition par RNAi de l'expression du gène MP300 a été réalisée jusqu'à 15 jours post-injections. Les résultats d'inhibition de l'expression du gène MP300 montrent qu'une réaction se met en place avec davantage de variations au cours du temps que chez *E. variegatus* (figure 3) et que l'inhibition de l'expression de ce gène est encore visible 15 jours post injection. Une grande variabilité de réponse à l'injection d'ARNdb MP300 a aussi été observée chez les individus de cet insecte.

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?



**Figure 3.** Inhibition de l'expression du gène MP300 chez *Scaphoideus titanus* calculée avec la formule  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ARNdb cible}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ANRdb GFP}}$ . Le temps J0T correspond aux insectes témoins non injectés ; après injection les insectes ont été mis en latence sur des fèves et prélevés 3 à 15 jours après injection (J3 à J15). \*,  $P < 0.05$  avec le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis en comparaison avec les insectes témoins non injectés.

Nous avons également testé l'inhibition de l'expression du gène codant la protéine adaptatrice AP1 (sous-unité beta) probablement impliqués dans la transmission des phytoplasmes (résultats non publiés). Les ARNdb synthétisés ont une taille de 361 pb et ont été utilisés à la même concentration (2  $\mu\text{g/mL}$ ) lors des injections des insectes. Des amorces permettant d'amplifier un fragment de 159 pb ont été sélectionnées comme précédemment pour permettre la quantification des transcrits. Les premiers résultats sont comparables à ceux obtenus avec le gène MP300. Les  $2^{\Delta\Delta Ct}$  augmentent de 0.6 ( $\pm 0.4$ , témoins sains) à 2.7 ( $\pm 1.9$ ) 3 jour pi et à 5.2 ( $\pm 2.9$ ) 6 jours pi.

Ces expérimentations seront renouvelées 2 fois et le taux de survie des insectes sera évaluée en fonction de l'ARNdb injectés. Ces résultats montrent pour la première fois que l'inhibition de gènes par RNAi est effective chez l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*.

## **Tâche 2. ARN interférence par immersion**

Des premiers essais ont été effectués avec des *E. variegatus* adultes et au stade larvaire. Lors de ces expérimentations nous nous sommes aperçu que les insectes ne s'imprégnaient pas de notre préparation d'ARNdb dans de l'eau, mais se trouvaient à côté des gouttes d'imprégnation. Nous avons donc testé plusieurs agents mouillant sur la survie d'*E. variegatus* et leur capacité à s'imprégner de bleu de méthylène.

## Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

Les insectes ont d'abord été immergés 1 ou 5 minutes dans une solution contenant divers agents mouillants (CTAB, SDS, Tween 20, Triton X100 et Silwet L77) à différentes concentrations (Tableau 1) et placés dans un tube 2 mL dont le bouchon a été rempli d'HEPES-sucrose afin que les insectes puissent se nourrir. Trois essais ont été réalisés mais seule l'expérience la plus complète est présentée dans le tableau 2.

**Tableau 1.** Effet mouillant du CTAB, SDS, Tween 20, Triton X100 et Silwet L77, survie des *E. variegatus* et coloration des insectes.

Agent mouillant	Concentration	Temps	Effet mouillant <sup>a</sup>	Survie insecte <sup>b</sup>	Coloration au bleu <sup>c</sup>
CTAB	10.0 g/L	1 min	visible	0/2 A + 0/1 L	+++
	1.0 g/L	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+++
	0.1 g/L	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	++
SDS	10.0%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	1.0%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	0.1%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
Tween 20	10.0%	1 min	visible	0/2 A + 1/1 L	+++
	1.0%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	++
	0.1%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
Triton X100	10.0%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+++
	1.0%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+++
	0.1%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
Silwet L77	1.00%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	0.10%	1 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	0.01%	1 min	non	2/2 A + 1/1 L	+
H2O		1 min	non	2/2 A + 1/1 L	-
CTAB	10.0 g/L	ND	ND	ND	ND
	1.0 g/L	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
	0.1 g/L	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
SDS	10.0%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
	1.0%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	0.1%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	++
Tween 20	10.0%	5 min	visible	1/2 A + 0/1 L	-
	1.0%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
	0.1%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+
Triton X100	10.0%	5 min	visible	1/2 A + 0/1 L	+++
	1.0%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+++
	0.1%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	+++
Silwet L77	1.00%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
	0.10%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
	0.01%	5 min	visible	2/2 A + 1/1 L	-
H2O		5 min	non	2/2 A + 1/1 L	-

a : insecte immergé dans la goutte

b : après 1 jour passé dans un tube + HEPES/sucrose dans le bouchon; A : adulte, L : larve



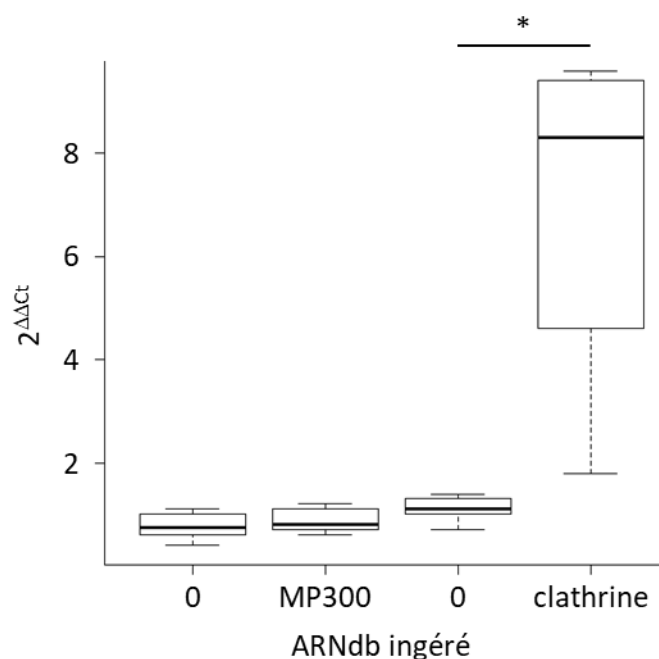
c : observation de la coloration des insectes par le bleu de méthylène 24h après l'immersion

Les résultats montrent que les insectes sont résistants à l'effet des différents agents mouillant. Seule la concentration la plus élevée du CTAB, Tween 20 et Triton X100 a induit de la mortalité chez les insectes.

L'addition des agents mouillant à l'eau a permis d'immerger les insectes dans les gouttes et ainsi mettre le colorant en contact de la cuticule des insectes. La coloration au bleu de méthylène a été observée en surface des insectes avec un effet agent mouillant dépendant mais aucune coloration des tissus internes n'a pu être observée. Ces résultats suggèrent que ces agents mouillant seraient efficaces pour permettre le contact des ARNdb avec les insectes mais le défaut de pénétration du colorant dans l'insecte ne nous a pas encouragé à poursuivre ces essais. Nous avons plutôt choisi de tester l'inhibition de l'expression des gènes par ingestion, une méthode d'application efficace sur insectes (Coleman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Mitter *et al.*, 2017; Mulot *et al.*, 2018).

Des adultes *E. variegatus* ont ingéré une solution HEPES-sucrose + 1 mg/mL d'ARNdb GFP, MP300 ou clathrine pendant 2 jours en tube, puis mis sur fève pendant 3 jours. Au bout des 5 jours, le taux de survie des insectes était de 66% après ingestion d'HEPES-sucrose, 76% de survie après ingestion d'HEPES-sucrose + ARNdb GFP, 42% de survie après ingestion d'HEPES-sucrose + ARNdb MP300 et 41% de survie après ingestion d'HEPES-sucrose + ARNdb clathrine. L'ingestion des ARNdb MP300 a induit davantage de mortalité que les ARNdb GFP comme dans les expérimentations d'injection d'ARNdb contrairement à la clathrine où seule l'ingestion d'ARNdb clathrine a induit une hausse de la mortalité des insectes.

La quantification des ARNm MP300 et clathrine à 5 jours a montré une diminution significative des ARNm clathrine, mais aucune modification pour les ARNm MP300 (figure 4).



**Figure 4.** Inhibition de l'expression des gènes MP300 et clathrine chez *Euscelidius variegatus* calculée avec la formule  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ARNdb cible}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{ménage(tubuline)}})_{\text{Injecté ANRdb GFP}}$  2 jours après ingestion des ARNdb et 3 jours de latence sur fève. Le point 0 correspond aux insectes sains ayant ingéré de l'HEPES-sucrose et les points MP300 et clathrine aux insectes ayant ingéré de l'HEPES-sucrose + ARNdb MP300 ou clathrine.  $P < 0.05$  avec le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis en comparaison avec les insectes sains 0.

Les différences de taux d'inhibition de l'expression des gènes MP300 et clathrine lors de l'ingestion est peut-être dû à l'expression plus élevée du gène de la clathrine que celui de la protéine MP300 dans les cellules épithéliales intestinales avec lesquelles les ARNdb ont été en contact en premier. En effet, nous ne connaissons pas les propriétés de diffusion des ARNdb dans les cicadelles *Euscelidius* et *Scaphoideus*. Il se peut que peu d'ARNdb aient atteint les cellules musculaires ou qu'un temps plus long soit nécessaire pour observer une diminution des transcrits. Cependant, cette expérimentation prometteuse sera reproduite et réalisée avec des adultes *Scaphoideus titanus*.

## BIBLIOGRAPHIE

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

Coleman, A.D., Wouters, R.H.M., Mugford, S.T., and Hogenhout, S.A. (2015) Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J Exp Bot* 66: 541–548.

Li, H., Guan, R., Guo, H., and Miao, X. (2015) New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ* 38: 2277–2285.

Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., et al. (2017) Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat Plants* 3: 16207.

Mulot, M., Monsion, B., Boissinot, S., Rastegar, M., Meyer, S., Bochet, N., and Brault, V. (2018) Transmission of Turnip yellows virus by *Myzus persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein. *Front Microbiol* 9: 457.

Un traitement par ARN interférence pour lutter contre la flavescence dorée ?

## **ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS**

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

*Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES**

*Merci de joindre des tirés à part, et d'indiquer les restrictions éventuelles en termes de droits de reproduction (notamment sur le site Internet du MTES). Notez que ce rapport pourra être mis en ligne sur le site Internet du MTES.*

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES A PARAITRE**

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES**

## **ANNEXE : PARTIE CONFIDENTIELLE**

*Vous pouvez insérer ici toute information ou résultat qui revêt une part de confidentialité.*

*Merci de préciser le degré de confidentialité de ces données.*

*Nous vous recommandons de préciser dans la partie non confidentielle l'existence de ces données confidentielles et d'expliquer la raison de leur confidentialité.*

*Cette partie ne sera pas diffusée sur le site Internet du Ministère.*

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

*Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*