



HAL
open science

Amélioration des stratégies de lutte contre le déperissement de la lavande et du lavandin

Eric Chaisse, Xavier Foissac, Eric Verdin, F. Nicolè, J.P. Bouverat-Bernier,
Sandrine Jagoueix-Eveillard, O. Semetey, Jonathan Gaudin, Marie Fontaine,
Jean-Luc Danet, et al.

► To cite this version:

Eric Chaisse, Xavier Foissac, Eric Verdin, F. Nicolè, J.P. Bouverat-Bernier, et al.. Amélioration des stratégies de lutte contre le déperissement de la lavande et du lavandin. *Innovations Agronomiques*, 2012, 25, pp.179-192. hal-02651108

HAL Id: hal-02651108

<https://hal.inrae.fr/hal-02651108>

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives | 4.0
International License

Amélioration des stratégies de lutte contre le dépérissement de la lavande et du lavandin

Chaisse E.¹, Foissac X.², Verdin E.³, Nicolè F.⁴, Bouverat-Bernier J.P.⁵, Jagoueix-Eveillard S.⁶, Semetey O.⁷, Gaudin J.⁷, Fontaine M.¹, Danet J.L.², Moja S.⁴, Conord C.⁴, Jullien F.⁴, Legendre L.⁴, Gallois P.⁵

¹ CRIEPPAM, Les Quintrands, Route de Volx, 04100 Manosque

² INRA, UMR 1332 Biologie du fruit et pathologie, Equipe Mollicutes, Groupe étiologie et épidémiologie des bactérioses phloémiennes, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon

³ INRA, Unité de pathologie végétale, UR407, Domaine Saint Maurice, BP 94, 84143 Montfavet cedex

⁴ Université Jean Monnet, LBVpam, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42023 St Etienne cedex 2

⁵ ITEIPMAI, BP 09, Melay, 49120 Chemillé

⁶ INRA, UMR 1332 Biologie du fruit et pathologie, Equipe Mollicutes, Groupe réponse de la plante aux bactérioses phloémiennes, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon

⁷ CIHEF, Les Quintrands, Route de Volx, 04100 Manosque

Correspondance : eric.chaisse@crieppam.fr

Résumé

La lavande et le lavandin sont des cultures emblématiques de Haute Provence, victimes d'un dépérissement depuis quelques décennies. L'agent étiologique de ce dépérissement est le phytoplasme du stolbur, et le principal vecteur de ce phytoplasme est la cicadelle *Hyalesthes obsoletus*. Une technique de diagnostic sensible et fiable a été mise au point, et a permis de sécuriser la certification du matériel végétal produit selon le cahier des charges plants sains. Une étude épidémiologique de grande envergure a montré que les parcelles étaient infectées par 16 génotypes différents du phytoplasme du stolbur, et que la maladie se propageait surtout de lavande(in) à lavande(in), et de lavanderaies à lavanderaies. Enfin, l'étude du phénomène de tolérance a montré que la sensibilité au dépérissement ne serait pas liée à la relation plante-phytoplasme, mais plus vraisemblablement à l'interaction de la cicadelle avec les plantes. Cette cicadelle est présente dans toutes les parcelles cultivées, mais à des effectifs très variables. Un génotypage AFLP a également montré que la diversité génétique des lavandes sauvages était assez restreinte, et que la sélection génétique effectuée par la filière l'avait très légèrement réduite.

Mots-clés : lavande, lavandin, dépérissement, phytoplasme du stolbur, épidémiologie, diagnostic, tolérance, *Hyalesthes obsoletus*

Abstract: Improvement of the strategies to control yellow decline of lavender and lavandin

Lavender and lavandin are symbolic crops in south-eastern France, in the region of Haute-Provence, but they have been affected by yellow decline for decades. The etiological agent which is involved in this decline is the stolbur phytoplasma, which is transmitted by the cixiidae *Hyalesthes obsoletus*. A reliable diagnosis has been developed, and permitted to secure the specification of phytosanitary certified material, according to the specifications "healthy plants". A large epidemiological survey identified 16 genotypes of the stolbur phytoplasma. The study demonstrated that the epidemics mainly propagated from lavender to lavender. Finally, the study of the mechanism of tolerance showed that lavender and lavandin susceptibility was not correlated with the relation plant - phytoplasma, but more likely with the interaction of the insect with the plant. The insect is present in all cultivated plots, but in

very variable densities. AFLP genotyping has also shown that genetic diversity of wild lavanders was quite restricted, and that genetic selection reduced it only a little.

Keywords: lavander, lavandin, yellow decline, stolbur phytoplasma, epidemiology, diagnosis, tolerance, *Hyalesthes obsoletus*

Introduction

Les cultures de lavande et de lavandin en France sont victimes depuis plusieurs décennies d'un +ement dont l'ampleur ne cesse de croître. L'identification de l'agent à l'origine de la maladie, le phytoplasme du stolbur, et de son principal vecteur, la cicadelle *Hyalesthes obsoletus*, ainsi que la mise à disposition des producteurs de variétés tolérantes et de plants sains, ne semblent pas suffisantes pour lutter contre cette pathologie, et les cultures sont aujourd'hui en péril.

Devant l'ampleur du phénomène, la profession a souhaité mettre en place un nouveau programme opérationnel. Ce programme est composé de trois grands thèmes, visant chacun à répondre à un enjeu particulier :

- améliorer et valider une technique de diagnostic sensible et fiable permettant la détection du phytoplasme du stolbur dans les plants de lavande et de lavandin, de façon à sécuriser la certification du matériel végétal produit selon le cahier des charges plants sains;
- estimer la dynamique de recontamination des parcelles après plantation, par une campagne de surveillance épidémiologique de grande envergure ;
- comprendre le phénomène de tolérance et son impact sur la cinétique de l'épidémie, en déterminant la proportion de lavandes et de lavandins tolérants porteuse du phytoplasme, la charge et la répartition des phytoplasmes dans ces plantes et la diversité génétique des lavandes cultivées.

Ce projet a reposé sur un partenariat entre le CIHEF, Comité Interprofessionnel des Huiles Essentielles Françaises (chef de file), le CRIEPPAM, Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (chef de projet), l'INRA d'Avignon, l'INRA de Bordeaux, le LBVPAM, Laboratoire de Biologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales et l'ITEIPMAI, Institut Technique Interprofessionnel des Plantes à Parfum, Médicinales et Aromatiques.

1 Amélioration du diagnostic pour un renforcement de la certification des plants

1.1 Mise au point du test Q-PCR sur lavande et lavandin

La méthode utilisée a été de transférer sur lavande et lavandin une technique déjà utilisée avec succès pour détecter le phytoplasme du stolbur sur la vigne. Il s'agit d'une technique de détection moléculaire par PCR quantitative (Q-PCR) utilisant la technologie Taqman[®]. Différents paramètres ont été évalués afin d'optimiser la technique. Sur 3 ans, le test a été évalué sur 8077 échantillons prélevés sur le terrain (plantes de lavande ou de lavandin). Les résultats obtenus ont permis d'établir des seuils de détection pour fiabiliser le diagnostic. Ces seuils sont les suivants (le Ct représente le nombre de cycles PCR à partir duquel on observe un accroissement de la fluorescence) :

- les échantillons présentant un Ct < 37 sont considérés comme positifs,
- les échantillons présentant un 37 < Ct < 41 sont considérés comme douteux (non répétables et/ou non reproductibles),
- les échantillons présentant un Ct > 41 sont considérés comme négatifs.

1.2 Contrôle des pépinières pour la présence du Stolbur

Des pépinières de la filière « plants sains » et de la filière traditionnelle ont été suivies, représentant un total de 3156 plants de lavande et lavandin analysés.

1.2.1 La filière « plants sains »

Le parc de pieds grand-mères issus de la régénération in vitro, conservé au CRIEPPAM, ainsi que 12 pépinières de la filière « plants sains » ont été suivies.

- Sur les 597 pieds grand-mères de différentes variétés qui ont été analysés, aucun ne s'est révélé positif vis-à-vis du phytoplasme du stolbur.
- 574 échantillons provenant de pieds mères ou de jeunes plants protégés par du filet insect-proof ont été testés. Aucun plant n'a été détecté positif, sauf dans une pépinière où la protection anti-insectes avait été défectueuse.
- Pour les plants sains de la variété Grosso, la couverture par des protections anti-insectes n'est pas obligatoire dans les zones de culture pas ou peu dépérissantes. Des plants ont été testés positifs dans une des 5 pépinières testées, ce qui signifie que des cultures non protégées peuvent être infectées.

1.2.2 La filière traditionnelle

Cette filière regroupe les pépinières dont l'ensemble du schéma de production n'est pas protégé par des protections anti-insectes. La présence du phytoplasme a été confirmée chez presque tous ces pépiniéristes.

1.3 Recherche de la présence du phytoplasme du Stolbur dans trois jeunes lavanderaies

Trois jeunes lavanderaies de lavandin Grosso (18 mois) des Alpes-de-Haute-Provence situées dans une zone fortement affectée par le dépérissement ont été prospectées. Le phytoplasme du stolbur a été mis en évidence dans les trois. Malgré l'utilisation de plants sains, la colonisation par *H. obsoletus* peut induire d'importants dégâts dès la deuxième année après plantation.

2. Etiologie et épidémiologie du dépérissement bactérien

L'incidence du dépérissement a été mesurée dans une vingtaine de parcelles par comptage sur 1000 plants. Dans chaque parcelle, 15 plantes malades et 4 saines étaient échantillonnées puis soumises au test de détection du phytoplasme du stolbur. Les souches détectées ont été génotypées notamment par séquençage du gène *secY*. Les insectes ont été dénombrés après des captures à l'aspirateur de 5 et 15 minutes. Puis leur ADN a été extrait et un outil de diagnostic-génotypage a permis de génotyper les souches portées par les insectes *H. obsoletus*. Enfin, la souche S17, prédominante, a été transmise par insecte à la pervenche de Madagascar.

2.1 Incidence du dépérissement 2008-2010

Dans la majorité des parcelles, on constate une augmentation du dépérissement. Cette progression peut être lente, moyenne ou rapide. Il est important de préciser qu'il s'agit là du dépérissement au sens large, incluant tous les facteurs biotiques et abiotiques, mais aussi la charge initiale en phytoplasme de la plantation lorsque les plants ne proviennent pas de la filière plants sains.

2.2 Prévalence du phytoplasme du stolbur pour les années 2008-2009

L'extraction d'ADN et le diagnostic Q-PCR Taqman ont été appliqués aux 1600 lavandes ou lavandins prélevés pour ces deux années. Les résultats sont sans équivoque : le taux de plantes infectées par le

phytoplasme du stolbur est plus élevé à l'automne qu'au printemps, et les lavandes sont plus souvent infectées par le phytoplasme que les lavandins.

2.3 Vérification de l'association dépérissement de la lavande (in) et de l'infection par le phytoplasme du stolbur

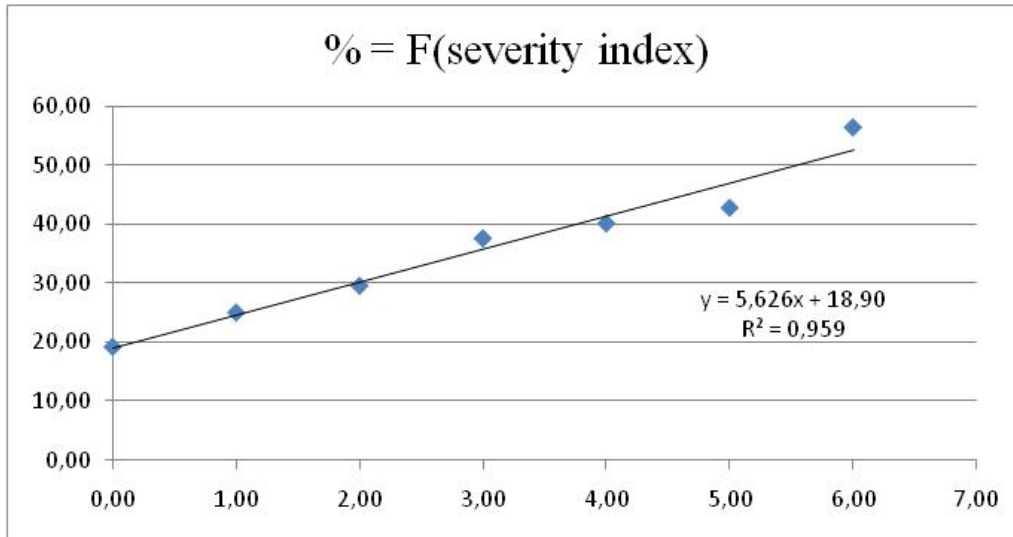


Figure 1 : Corrélation entre indice de sévérité et pourcentage de plantes positives au diagnostic phytoplasme du stolbur

Comme le montre la Figure 1, plus l'indice de sévérité est élevé et plus le pourcentage de plants infectés est élevé. A l'automne, les chiffres sont encore plus marquants. Cette corrélation est très forte (R^2 proche de 1). Ce résultat signifie que le phytoplasme du stolbur est bien l'agent biotique majeur du dépérissement de la lavande et du lavandin.

2.4 Evolution du dépérissement bactérien dû au phytoplasme du stolbur dans les parcelles au cours du temps

Chez les lavandins dits tolérants, le pourcentage de lavandins infectés est variable suivant les parcelles, sans qu'on puisse corrélérer cette variation à des différences d'altitude, de bassin de production, d'année de plantation ou de qualité des plants.

En ce qui concerne les lavandins sensibles, les données montrent des taux d'infection et des charges élevés.

Dans le cas des populations sélectionnées de lavande et des lavandes clonales, une plus grande incidence de l'infection est observée par rapport aux lavandins. Aucune ne semble réellement tolérante, dans le sens où elles sont fortement dépérisantes et infectées. Chez les lavandes de population locales et bleues traditionnelles, l'incidence et la charge en phytoplasme du stolbur sont très élevées. Ainsi, les plantations atteignent rarement leur quatrième année.

2.5 Cinétique de l'épidémie de phytoplasme du Stolbur du printemps 2008 à l'automne 2010

En testant de nouveau des plants qui avaient été testés négatifs lors des précédentes campagnes, nous avons pu comparer les niveaux de contamination des étés 2008, 2009 et 2010.

Les données obtenues montrent que l'année 2010 a été très propice et ceci de façon générale, à la propagation de la maladie. Cette année-là, *H. obsoletus* a d'ailleurs été capturé en abondance.

L'épidémie s'est moins propagée en 2008-2009 dans les lavandins Super et Grosso que dans les autres cultivars, mais elle reste néanmoins notable. Les variations climatiques annuelles influencent certainement fortement la cinétique de l'épidémie. Il est généralement reconnu que des hivers et des printemps doux ou chauds favorisent la survie et le développement des larves des insectes vecteurs mais aussi la multiplication de la bactérie.

2.6 Génotypage des souches de phytoplasme du stolbur détectées dans les lavandes(ins), impact du compartiment sauvage et distribution des génotypes

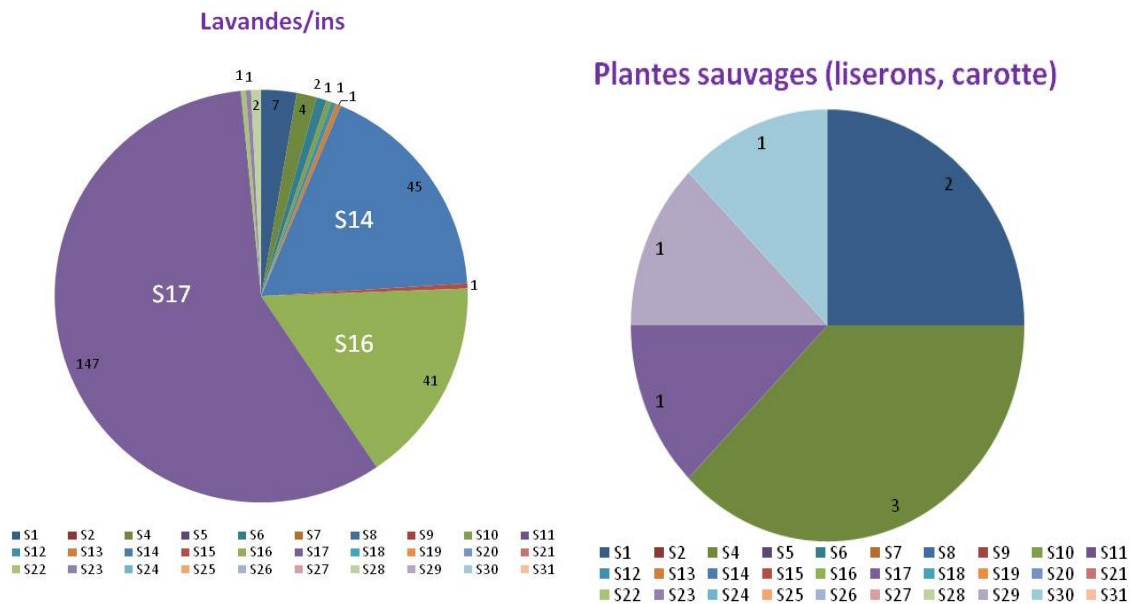


Figure 2 : Génotypes secY détectés dans les lavanderaies et les hôtes sauvages du phytoplasme du stolbur

La Figure 2 montre que les lavandes(ins) sont très majoritairement infectés par des souches de phytoplasmes du génotype S17, puis S16 et S14, alors que les liserons, carottes sauvages et autres plantes sauvages sont infectés par les génotypes S4 et S1 qui prévalent en France dans les cultures pérennes comme la vigne. Malgré le nombre faible de plantes sauvages trouvées infectées parmi plus de 200 testées, on peut conclure que le compartiment sauvage n'est pas à l'origine des épidémies comme c'est le cas pour le stolbur-bois noir de la vigne ou le stolbur des solanacées. L'épidémie se propage donc de lavande(in) à lavande(in) et de lavanderaies en lavanderaies.

Les parcelles sont généralement infectées par plusieurs génotypes de phytoplasme du stolbur.

2.7 Caractère épidémique des génotypes du phytoplasme du stolbur

La souche la plus prévalente mais aussi la plus épidémique est le génotype S17. Le génotype S16 est lui aussi très épidémique bien que moins représenté dans les lavanderaies au début de l'étude (printemps 2008). La souche S14 qui possédait une prévalence supérieure à celle de la souche S16 au début de l'étude semble non épidémique. Sa propagation par du matériel végétal infecté, multiplié dans les pépinières est à envisager. La souche S14 correspond à la souche DEP transmise à la pervenche de Madagascar à partir de lavandin malade dans les années 70.

2.8 Populations de *H. obsoletus*, taux de portage en phytoplasme du stolbur et génotypes portés

Les populations sont significativement plus élevées sur lavande que sur lavandin. Les taux de portage sont très variables, de 6 à 66%. Quel que soit le type de cultivar sur lequel les insectes sont prélevés, les populations de *H. obsoletus* véhiculent majoritairement le phytoplasme du stolbur génotype S17 en

2009. Les génotypes S16 puis S14 sont plus faiblement représentés. Ces résultats sont parfaitement corrélés aux incidences relatives de ces génotypes mesurées dans les lavandes(ins) et confirment notamment le caractère peu épidémique de la souche S14.

2.9 Caractérisation phylogénétique des souches de phytoplasmes du stolbur détectées dans les lavandes(ins) et transmission du génotype S17 à la Pervenche de Madagascar

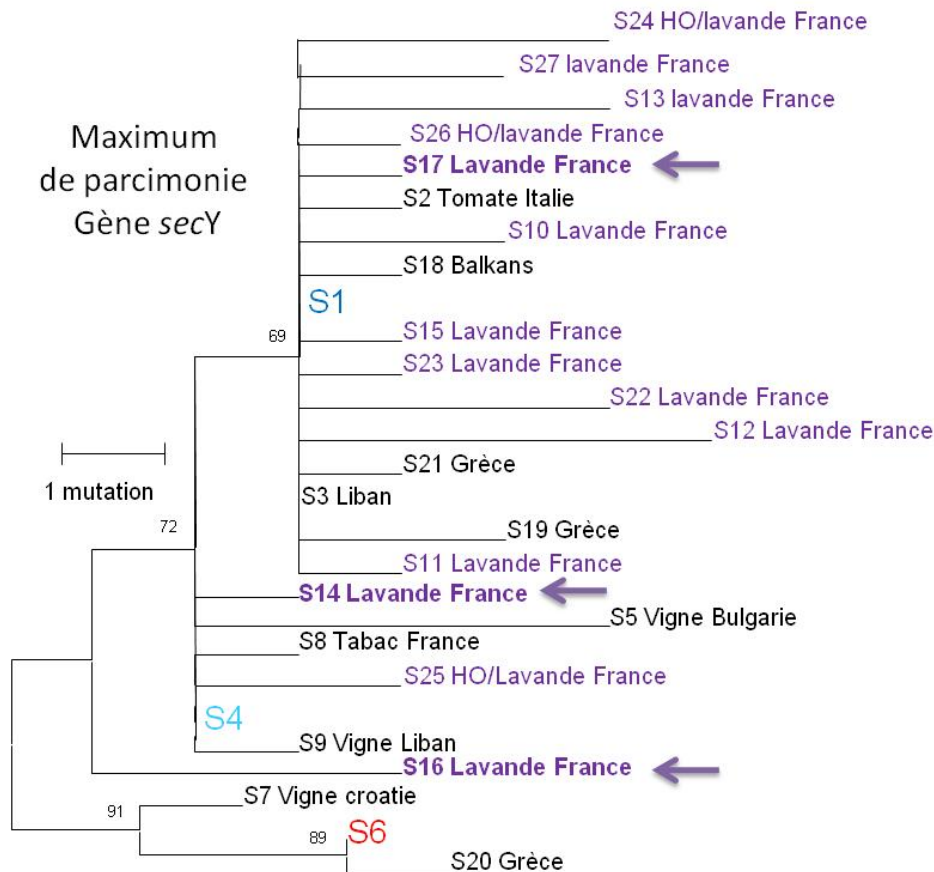


Figure 3 : Analyse phylogénétique du gène *secY* des souches du phytoplasme du stolbur détectées en lavanderaies (plantes et insectes). Les génotypes S1, S4 et S6 sont très fréquents en Europe Occidentale.

Les séquences du gène *secY* des différents génotypes détectés dans les lavandes(ins) ont été comparées aux séquences disponibles dans nos bases de données (UMR1332 INRA de Bordeaux et réseau européen SEE-ERANET). La Figure 3 montre que quasiment toutes les souches détectées en lavanderaies et dans les insectes vecteurs *H. obsoletus* (13/16) sont spécifiques de l'agro-système lavandicole du sud-est de la France. On peut conclure, que l'association lavandes(ins)/phytoplasme du stolbur est très ancienne, que plusieurs vagues épidémiques se sont succédées, et que la plus récente semble être celle que l'on peut attribuer au génotype S17.

La souche S17 a été inoculée, via des insectes, à la pervenche de Madagascar, et une lignée est désormais maintenue par greffage de pervenche à pervenche.

3. Recherche d'un marqueur précoce de la tolérance au dépérissement à phytoplasme

La recherche d'une éventuelle corrélation entre tolérance et teneur en acide rosmarinique s'est faite en trois étapes :

- prélèvement d'échantillons : l'échantillonnage devait être le plus exhaustif possible en termes de diversité variétale et de gravité de dépérissement. L'Iteipmai a pu bénéficier des prélèvements réalisés dans le cadre des autres actions du programme ; une information complémentaire sur la présence de phytoplasme était ainsi disponible ;
- analyse par HPLC de la teneur en acide rosmarinique, et de la teneur en composés phénoliques, des échantillons prélevés. Ce travail a été réalisé au laboratoire d'analyses phytochimiques de l'Iteipmai ;
- traitement des données.

Sur les nombreux échantillons obtenus, seule une partie d'entre eux (23) a pu être analysée, du fait de la morphologie des échantillons (de sommités feuillues à bois pur), et de leur état de conservation. Les résultats de teneurs en acide rosmarinique s'échelonnent de 0,01 ‰ à 1,2 ‰. Cette forte disparité des valeurs se retrouve à l'intérieur d'une même variété de lavandin.

En conclusion, les teneurs en acide rosmarinique (de même que les teneurs de l'ensemble des composés phénoliques) ne semblent pas liées aux notes de dépérissement, ou à la détection de la présence du phytoplasme du Stolbur. Le dosage de l'acide rosmarinique ne peut donc malheureusement pas être utilisé en tant que test de détection précoce de la sensibilité des plants au dépérissement à Stolbur.

4. Etude de la dynamique de vol de *Hyalesthes obsoletus* sur la zone de production lavande / lavandin

NB : Seuls les résultats obtenus par l'Iteipmai sont présentés ci-dessous, car ils ont bénéficié de financements CASDAR (ce qui n'était pas le cas pour le CRIEPPAM et la FREDON PACA). Les résultats complets de ce réseau de piégeage sont disponibles dans le compte-rendu commun 2010 rédigé par ces trois structures. (Cf. site internet www.crieppam.fr – rubrique publications Casdar dépérissement).

Six lavanderaies de la Drôme ont été choisies pour cette étude, avec deux parcelles dans les principaux secteurs lavandicoles du département : le Diois, la Vallée du Rhône et les Baronnies. Dans chacune de ces six parcelles, cinq pièges englués de couleur jaune ont été disposés sur une surface de 5000 m² environ. Les relevés de pièges ont été effectués chaque semaine. Des aspirations ont été pratiquées dès que les pièges ont mis en évidence des sorties de cet insecte, en utilisant un aspirateur à dos à moteur thermique (type D-Vac). La méthode d'échantillonnage utilisée pour ces aspirations consiste à réaliser 50 impacts de quelques secondes, sur 50 plants, choisis de manière aléatoire et répartis de façon homogène sur l'ensemble de la parcelle. Les symptômes de dépérissement ont été notés sur 1000 plants par parcelle, selon la méthode définie dans l'action 2 du programme.

4.1 Importance des captures par parcelle

H. obsoletus a été détecté dans toutes les parcelles de lavande et lavandin, sans exception, et ce, quelle que soit la variété ou le secteur géographique. Les différences d'effectifs piégés d'une parcelle à l'autre sont extrêmement importantes puisque le nombre d'adultes piégés par parcelle varie de 2 à 380 pour la saison 2010.

4.2 Courbes de vol

En 2010, quelle que soit la parcelle, la date de début de vol est située entre la fin du mois de juin et la mi-juillet. Pour les trois parcelles de lavande fine, le début du vol coïncide avec le stade pleine floraison, alors que pour la parcelle de lavandin et celle de lavande aspic, il semble avoir lieu au stade « Hampe florale 10 cm » : la diversité des stades phénologiques observés semble indiquer que ce paramètre n'a

pas d'influence sur le début du vol de l'insecte. La période durant laquelle des *H. obsoletus* sont présents est comprise entre 7 et 9 semaines.

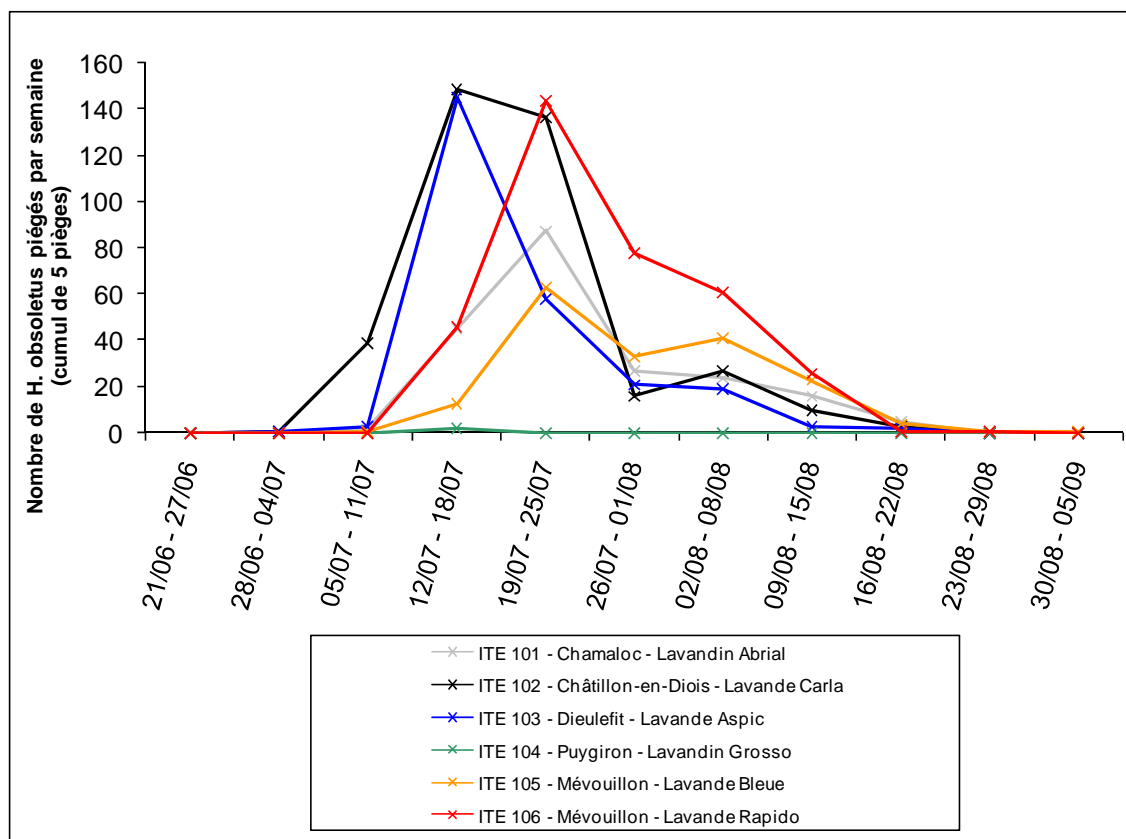


Figure 4 : Courbes de vol 2010 de *H. obsoletus* dans les 6 lavanderaies de la Drôme

4.3 Aspirations

Lors de cette campagne de piégeage 2010, les pièges chromo-attractifs ont permis de récolter un total de 1364 individus, alors que les aspirations n'ont permis d'en collecter que 126. Les pièges chromo-attractifs permettent donc de capturer un nombre de *H. obsoletus* bien plus important que les aspirations, du fait de leur fonctionnement en continu 24h/24 et 7j/7.

Le réseau de pièges mis en place en 2010 est donc bien adapté, et est indispensable pour acquérir un volume de données suffisant pour réaliser un suivi des populations de *H. obsoletus*. Cependant, les aspirations au D-Vac restent incontournables dans l'optique d'une capture d'individus vivants et en excellent état, notamment pour réaliser une détermination des espèces d'insectes.

4.4 Sex-ratio

Le sex-ratio est largement déséquilibré en faveur des mâles (86.2 % de mâles), la valeur minimale étant 81.4%, et la valeur maximale 93.4%.

4.5 Taux de portage en phytoplasme du stolbur

Une grande partie des *H. obsoletus* capturés et aspirés a été envoyée à l'INRA de Bordeaux (UMR GDPP) afin de déterminer par qPCR leur taux de portage en phytoplasme du Stolbur. Les valeurs déterminées pour ces deux parcelles sont dans la moyenne de ce qui est communément cités dans la littérature, à savoir autour de 30% des adultes infectés par le Stolbur. Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus dans le cadre de l'action 2.

5. Caractérisation du phénomène de tolérance de la lavande et du lavandin au dépérissement

5.1 Etude du niveau d'infection et de la répartition des phytoplasmes dans les plantes sensibles et tolérantes

Un standard a été mis au point à partir du gène MAP du phytoplasme du stolbur, afin de quantifier les phytoplasmes dans chaque échantillon de lavande et de lavandin.

Sur les 3 années, plus de 2500 plantes ont été testées (dont 700 étaient porteuses du phytoplasme). Les taux obtenus ont été analysés selon la variété, la sensibilité au dépérissement de cette variété, la sévérité des symptômes et la période de prélèvement de l'échantillon. En 2009, une étude de cinétique de l'infection a aussi été réalisée, en analysant chaque mois les mêmes plantes, pendant une année, afin d'observer la multiplication du phytoplasme dans les plantes sensibles et dans les plantes tolérantes.

Il ressort de cette étude que :

- il n'y a pas de différence statistique entre le taux de phytoplasme présent dans les lavandes et celui présent dans les lavandins ;
- les lavandins présentent un taux en phytoplasme similaire, qu'ils soient sensibles ou tolérants ;
- la sévérité des symptômes et la teneur en phytoplasmes dans les plantes ne sont pas corrélées ;
- le développement de la maladie est souvent erratique au cours des saisons ;
- la détection du phytoplasme peut devenir négative, parfois temporairement, même si elle était initialement positive et s'accompagnait parfois d'un taux élevé ;
- il n'y a pas d'évolution plus rapide de la quantité de phytoplasmes dans les plantes sensibles que dans les plantes tolérantes.

La sensibilité au dépérissement n'est pas liée au taux de phytoplasme du stolbur dans les lavandes(ins), mais plus vraisemblablement à l'interaction de *H. obsoletus* avec les lavandes(ins).

5.2 Etude de l'expression des gènes et liaison avec le niveau d'infection des lavandes et des lavandins

Les gènes candidats ont été choisis de façon à représenter des gènes dont l'expression ne varie pas avec l'infection, et qui pourront servir de témoins (EF1 alpha : un gène de facteur de transcription, Actine : un gène d'une protéine du cytosquelette, cytochrome oxidase COX), ainsi que des gènes en liaison avec la réponse de la plante à une agression ou des gènes dits de défense (phenylalanine ammonia-lyase : PAL, pathogenesis related protein 1 : PR1, Rubisco : Ru gène d'une protéine intervenant dans la photosynthèse). Il s'agit ensuite de comparer l'expression de ces gènes entre des plantes saines et infectées, et déterminer ainsi si le gène est sur- ou sous-exprimé.

Après des essais de greffage longs et peu fructueux, c'est finalement par bouturage que les plantes ont été obtenues.

La stabilité d'expression des gènes témoins a été vérifiée. Le gène Actine n'a pas été retenu car il présentait des variations d'expression trop importantes. Le gène EF1 alpha a été choisi comme témoin de référence. Cette étude, bien que limitée, a permis de constater que:

- l'expression des gènes PAL et Ru ne varie pas chez les lavandes(ins), qu'elles soient malades ou non, sensibles ou tolérantes ;

- les lavandes(ins) sensibles réagissent à la présence du stolbur en activant le gène d'une Pathogenesis Related protéine (PR1) (Figure 5) ;
- cette activation du gène PR1 n'a pas lieu chez les lavandes(ins) tolérants testés (Grosso et les individus de Rapido) (Figure 5).

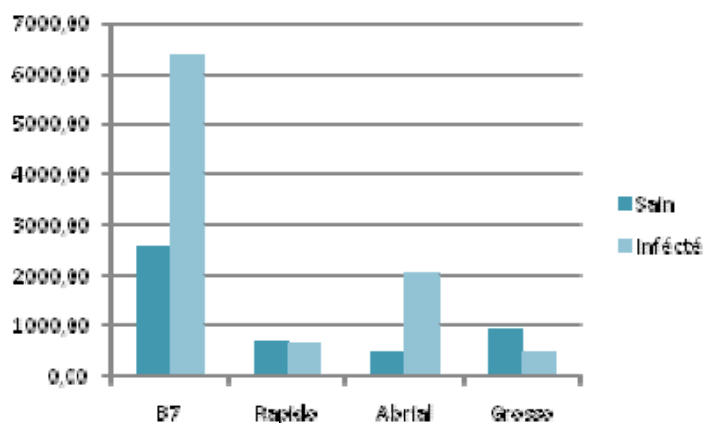


Figure 5 : Moyennes d'expression du gène PR1 chez chacun des cultivars testés (en unité arbitraire)

En conclusion, les plantes sensibles et tolérantes semblent avoir un comportement différent après infection.

6. Evaluation de la diversité génétique intraspécifique pour la recherche d'allèles d'intérêt corrélés à la tolérance au dépérissement

Deux méthodes analytiques ont été développées pour caractériser la diversité des plantes sauvages et cultivées de *Lavandula angustifolia* :

- génotypage par empreinte AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos et al, 1995) avec un jeu de 3 paires d'amorces sur ADN nucléaire de jeunes feuilles permettant d'obtenir 206 marqueurs polymorphes hautement répétables (choisis pour atteindre un taux de répétabilité de 100% pour chaque couple d'amorces),
- chémotypage par GC-MS d'extraits hexaniques d'inflorescences séchées suite à un traitement statistique exhaustif et non supervisé avec MSeasy (Nicolè et al, 2012) permettant d'extraire 143 molécules putatives.

Ces analyses ont été mises en œuvre sur une collection d'échantillons représentant 36 populations¹ de lavandes (18 champs cultivés, 3 lots de clones parentaux des populations améliorées et 18 populations sauvages). Chaque population est représentée par 20 plantes récoltées au hasard.

Une compilation de mesures morphologiques et écologiques enregistrées sur 13 populations sauvages par l'équipe du CNPMAI a été réalisée pour mettre en relation statistiquement la diversité génétique, la diversité chimique et les caractères morphologiques et écologiques au sein de l'espèce *L. angustifolia*.

6.1 Etat des lieux de la structuration de la diversité génétique des plantes sauvages et cultivées de lavande fine

¹ Le terme « population » est ici employé dans son sens écologique (un groupe d'individus appartenant à une même espèce et vivant sur une même aire géographique délimitée). Une population correspond à un site ou à un champ, quel que soit le type de lavande (lavande sauvage, lavande de population ou cultivar).

Toutes plantes confondues (sauvages et cultivées), la variabilité génétique est répartie comme suit : 37% entre pays (France, Italie, Espagne), 19% entre populations et 44% entre les individus dans une population (AMOVA, GenAlex 6.5, Peakall et Smouse, 2012). Cette variabilité entre pays permet de très bien différencier les populations sauvages de Calabre (Italie) et les trois populations espagnoles par rapport aux autres populations, sauvages ou cultivées, toutes françaises. Ces quatre populations différenciées présentent de faibles hétérozygoties et plusieurs marqueurs privés exclusifs. Ceci tend à indiquer un isolement géographique assez ancien.

Sauvages ou cultivées, les autres populations se différencient peu génétiquement car la plupart de la variabilité se situe entre les individus d'une même population.

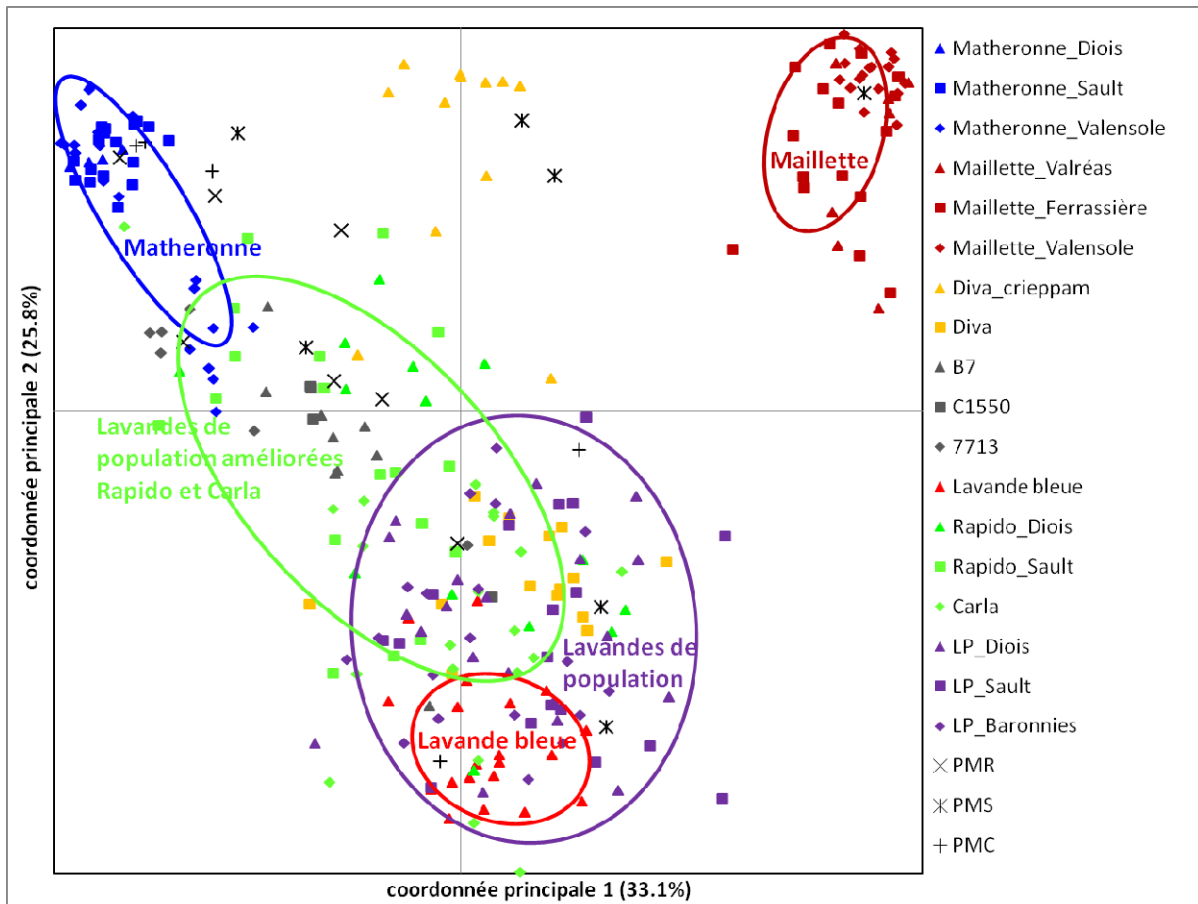


Figure 6 : Analyse en coordonnées principales sur l'ensemble des géotypes AFLP (N=284) des lavandes cultivées (LP = lavandes cultivées de population, PMC = pieds-mères Carla, PMR = pieds-mères Rapido, PMS = pieds-mères Sara). Chaque point représente le géotype d'une plante et deux points proches sur le graphique sont proches génétiquement.

La structuration de la diversité génétique des plantes cultivées françaises peut être représentée par une analyse en coordonnées principales (ACoP) effectuée sur les 206 marqueurs AFLP polymorphes. L'ACoP montre les similarités génétiques entre plantes dans un espace à deux dimensions (Figure 6, R Development Core Team, 2011). Le pourcentage d'inertie qui montre les similarités génétiques entre plantes dans un espace à deux dimensions (Figure 6). Le pourcentage de variabilité expliquée de 59% indique un message structurant fort. Les cultivars Maillette (rouge foncé à droite) et Matheronne (bleu à gauche) sont assez homogènes, peu diversifiés et bien différenciés génétiquement des autres cultivars et populations. Le clone Maillette est particulièrement isolé génétiquement de toutes les autres lavandes cultivées. Les cultivars récents B7, C1550, 7713 (en gris) sont plus diversifiés génétiquement et plus proches de Matheronne que de Maillette. Les lavandes de populations se différencient nettement des clones Maillette et Matheronne (en violet en bas). La lavande bleue est proche des

lavandes de populations. Les populations améliorées de Carla et Rapido (en vert) sont très diversifiées et sont apparentées à la fois aux lavandes de populations et au cultivar Matheronne. Le clone Diva_crippam est bien défini génétiquement et semble partager ses origines entre Maillette et Matheronne. L'incohérence des résultats génétiques sur le deuxième prélèvement de Diva questionne la traçabilité des plantes et nécessitera une étude complémentaire.

La très bonne correspondance entre l'origine connue des clones parentaux de Rapido, Carla et Sara, et les résultats génétiques démontre la fiabilité de la technique d'empreinte génétique AFLP pour résoudre les relations génétiques complexes entre variétés chez *Lavandula angustifolia*.

6.2 Généalogie des différents cultivars

Le nombre de marqueurs AFLP générés fournit une résolution génétique suffisamment précise pour retracer la généalogie des individus d'une population même s'ils sont issus de plusieurs provenances, et étudier la traçabilité des variétés. Le logiciel d'assignation STRUCTURE compile cette information et en offre une visualisation (Figure 7, Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). Une population génétiquement homogène et différenciée des autres aura sa propre signature génétique et apparaîtra d'une seule couleur. Ainsi, Matheronne (en bleu), Maillette (en orange) et les lavandes de population (en jaune) sont relativement bien caractérisées génétiquement. Les cultivars plus récents C15-50, 77-13 et B7 sont vraisemblablement issus d'une sélection d'individus au sein de Matheronne (bleu) et des lavandes de population (jaune). Maillette et Matheronne trouvent leurs origines génétiques chez les lavandes de population (présence de bleu et d'orange dans les lavandes de populations).

D'autres tests d'assignation (résultats non présentés) confirment les origines des clones parentaux des populations améliorées Rapido et Carla dans le génome de Matheronne, de C15-50 et des lavandes de populations.

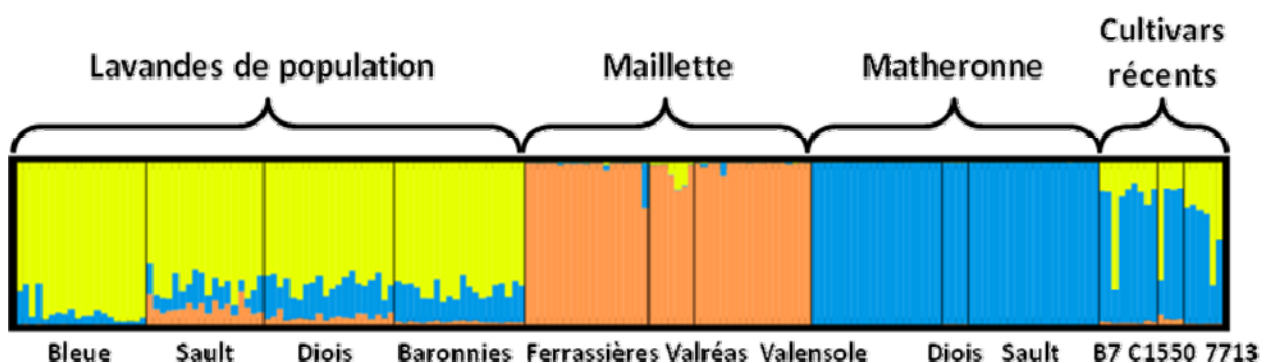


Figure 7 : Graphique d'assignation génétique. Pour chaque population, un rectangle vertical représente un individu. Chaque rectangle est divisé en segments colorés dont la longueur est proportionnelle à l'appartenance estimée (assignation) à l'un des 7 agrégats génétiques identifiés par le programme STRUCTURE. A chaque agrégat correspond une couleur.

6.3 Relations entre diversité génétique, diversité des chémotypes et variabilité morpho-anatomique dans les populations sauvages

Une analyse factorielle discriminante de la matrice des 143 caractères chimiques montre que les populations de Calabre et la sous-espèce *L. angustifolia pyrenaica* présente en Espagne se distinguent aussi bien génétiquement que chimiquement des populations des Alpes et des Causses. La congruence des résultats de structuration de la diversité chimique et de la diversité génétique met en évidence que la composition chimique des inflorescences peut être utilisée comme un bon indicateur pour différencier certaines populations sauvages. Cependant, à une échelle plus fine, au niveau de la zone provençale, la composition chimique n'est pas assez différenciée et résolutive : elle ne permet pas d'individualiser les populations.

De même, une analyse en composantes principales effectuée sur les caractères morphologiques des lavandes sauvages montre que certains caractères morpho-anatomiques tels que hauteur de la plante, longueur et densité de l'inflorescence, taille des feuilles, discriminent bien les populations et pourraient constituer des caractères diagnostiques de la quantité ou de la qualité en huile essentielle. Des mesures complémentaires devront être effectuées pour confirmer ce résultat préliminaire.

6.4 Evaluation de l'impact de la sélection variétale sur la diversité génétique

Les lavandes fines cultivées montrent une diversité génétique similaire à celle des populations sauvages. Les lavandes clonales présentent une diversité génétique significativement plus faible que les lavandes de population et les lavandes sauvages (test de Kruskal-Wallis $K=13.93$, $df=2$, $p=0.0009$). Comme attendu, les cultivars les plus anciens et les plus produits, Maillette et Matheronne, propagés par bouturage, ne présentent quasiment aucune variabilité génétique (0,06, soit seulement 14% de loci polymorphes). Les lavandes de population issues de la sélection pour la tolérance au dépérissement, Rapido et Carla, sont aussi variables génétiquement que les lavandes de population.

La diversité génétique des populations sauvages de lavande fine est de 0,125 en moyenne et varie de 0,081 à 0,161. La comparaison à d'autres espèces de lavandes méditerranéennes, avec le même indice de diversité, montre que le compartiment sauvage de *Lavandula angustifolia* présente une diversité génétique faible. En effet, la valeur moyenne est de 0,318 pour *L. multifida* (0,205-0,314; 8 populations sauvages, $N=80$, (Chograni *et al.*, 2008)) et de 0,305 pour *L. latifolia* (0,057-0,561; 21 populations sauvages $N=315$, (Herrera et Bazaga, 2008)).

En conclusion, la lavande fine cultivée reste donc proche des individus sauvages qui poussent spontanément dans les massifs des montagnes sèches provençales. Cependant, le réservoir génétique naturel apparaît limité et la domestication a contribué à réduire la diversité génétique. Cette faible diversité génétique du compartiment sauvage peut s'expliquer par le caractère endémique de l'espèce *L. angustifolia* dont l'aire de répartition géographique est réduite par rapport à celle de la lavande aspic (*L. latifolia*, Upson et Andrews, 2004). C'est grâce à la diversité génétique que la lavande fine s'est adaptée au cours de son évolution biologique à l'altitude, aux sols rocailloux, secs et calcaires. La richesse de son métabolisme secondaire, produisant l'huile essentielle aujourd'hui recherchée, constitue un moyen de défense et d'adaptation face aux variations environnementales. Dans le contexte actuel de changement climatique, il est nécessaire de préserver la diversité génétique et le potentiel d'adaptation dans les futurs programmes de sélection variétale. La lavande provençale, cultivée ou sauvage a tout le caractère d'une plante de terroir dont la sauvegarde devient prioritaire.

Conclusion

Les résultats de ces différents travaux ont permis de faire de grandes avancées dans la compréhension du phénomène de dépérissement des lavandes et des lavandins. Ils ont aussi ouvert les portes vers de nouvelles questions, tel que le rôle joué par l'insecte vecteur *Hyalosthes obsoletus* dans la cinétique de la maladie. Pour poursuivre la dynamique instaurée par ce programme et les collaborations mises en place entre les organismes techniques et ceux de recherche plus fondamentale, de nouveaux programmes ont été élaborés. L'un d'entre eux, programme CASDAR également, a débuté en 2012, et est porté par l'Iteipmai. Il s'est donné pour objectifs :

- d'identifier des modifications d'itinéraires de culture permettant d'améliorer la situation de la production,
- de déterminer si le comportement de l'insecte vecteur du phytoplasme permet d'expliquer le phénomène de tolérance à la maladie observé chez certaines variétés,
- de déduire de ces deux axes, de nouveaux critères de sélection utilisables dans les futurs programmes de sélection variétale.

Références bibliographiques

- Chograni H., Chokri M., Boussaid M., 2008. Genetic diversity and population structure in Tunisian *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 36 (5-6), 349–359
- Herrera C.M., Bazaga P., 2008. Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. *Heredity* 100, 275-285.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.J., 2000; Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Nicolè F., Guitton Y., Courtois E., Moja S., Legendre L., Hossaert-McKey M., 2012. MSeasy: unsupervised and untargeted GC-MS data processing. *Bioinformatics*, accepted.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Upton T., Andrews S., 2004. The genus *Lavandula*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew xiv, 442p.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van De Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic acids research* 23, 4407-4414.