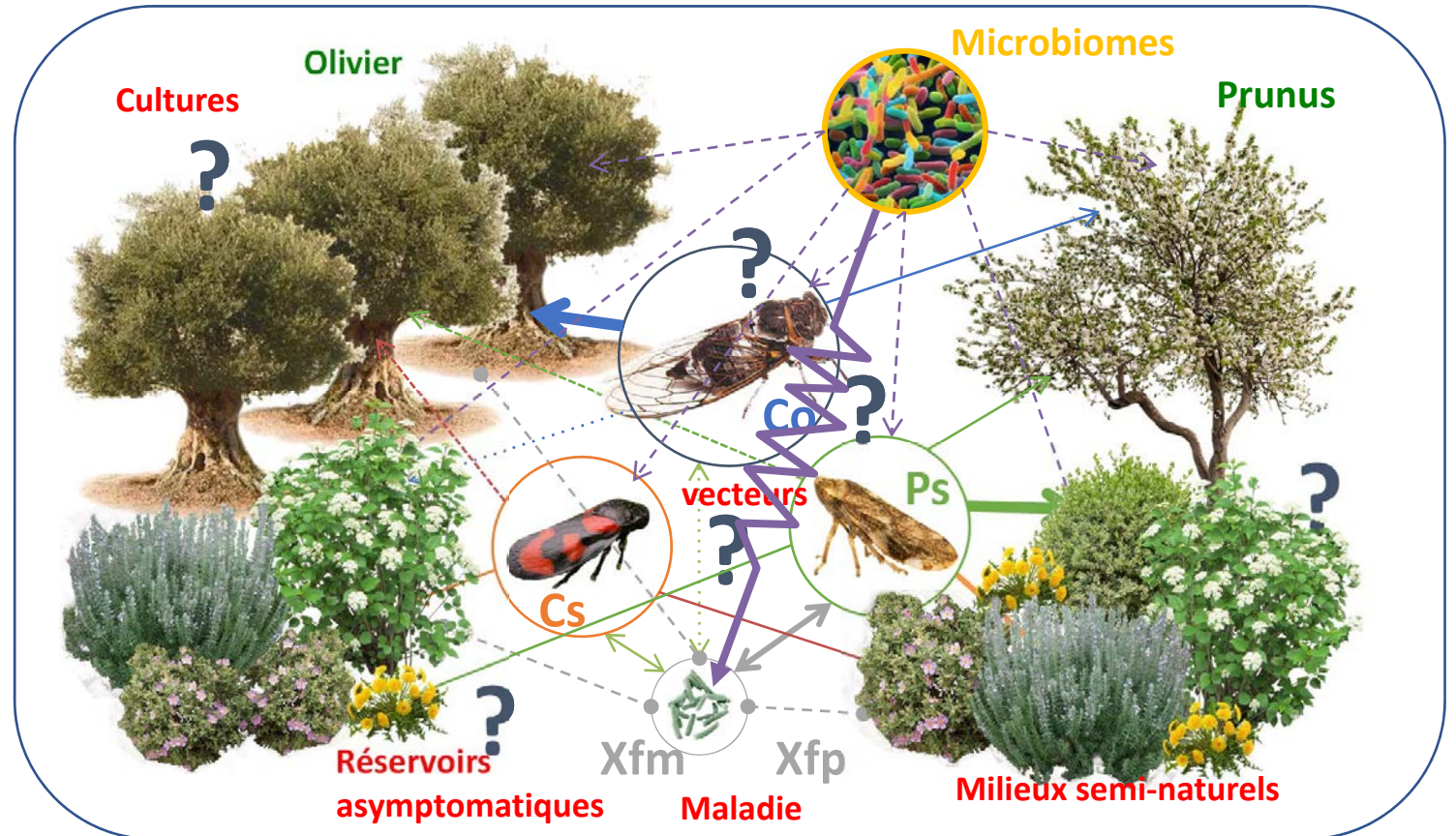


Caractériser les réseaux d'interactions plantes-vecteurs

pour mieux gérer et anticiper la progression du phytopathogène *Xylella fastidiosa*

Jean-Yves Rasplus, Jean-Pierre Rossi, Marguerite Chartois et Astrid Cruaud



Contexte

Xylella fastidiosa

Bactérie du xylème

Produit des biofilms qui obstruent les vaisseaux

Originaire des Amériques

Première description de la maladie sur vigne (Pierce 1892)

1949 : virus? (Hewitt et al.)

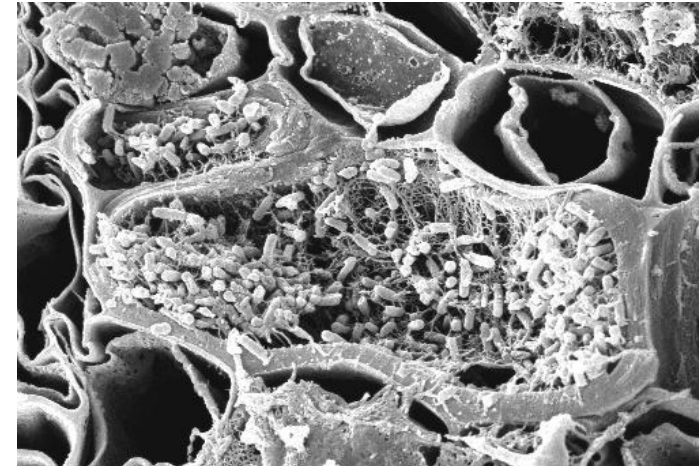
Premier isolement sur milieu en 1978 (Davis et al.)

Nommée en 1987 (Wells et al.)

1987 : Chlorose panachée des Citrus au Brésil

Fin des années 1990 : maladie de Pierce, California

2000 : premier pathogène de plante à avoir son génome séquencé



X.f. within a xylem vessel in the leaf of affected Chardonnay grape. (ca. x 4,000).

Photo by [E. W. Kitajima](#) (ESALQ/USP/Brazil).

« Some of the most significant new disease threats in the Americas. » Hopkins and Purcell 2002.

« One decade later, the bacterium [...] has risen from obscurity, new diseases have emerged, and the diseases it causes have become worldwide threats » Almeida and Nunney 2015

Taxonomie et spectre d'hôte

Espèce très généraliste (**560 espèces de plantes de 60 familles différentes**)

5 sous-espèces généralistes

Lignées génétiques avec spectres d'hôte plus réduits Nunney et al., 2013 (à confirmer)

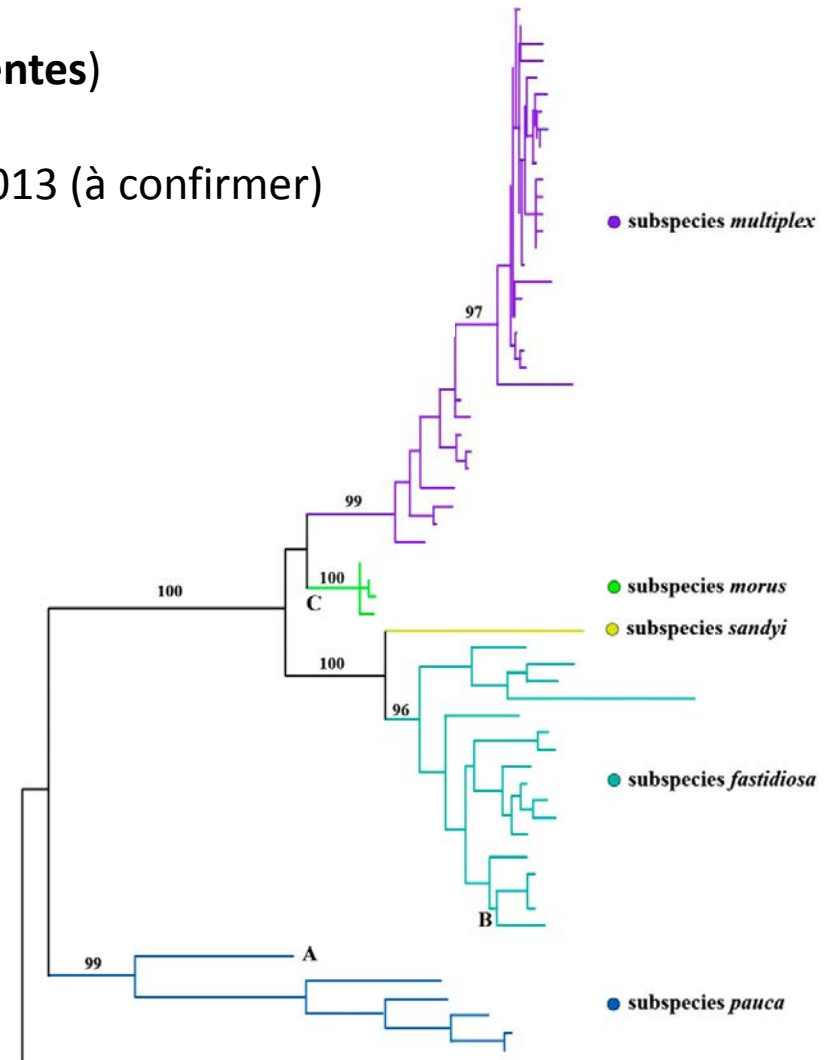
Xf multiplex (PDD, PLS) : Prunus, Quercus, Oliviers, Polygala etc

Xf fastidiosa (PD, ALS) : vigne, amandier, Quercus etc. 42 familles

Xf sandyi (OLS) : laurier rose, cafeiers

Xf morus : muriers (fastidiosa x multiplex)

Xf pauca (CVC) : agrumes, oliviers, cafeiers



Symptômes

brûlures foliaires, rappelant ceux provoqués par un stress hydrique



MAIS :

Existence de végétaux contaminés asymptomatiques qui peuvent passer inaperçus à l'occasion de contrôles visuels.

=> Réservoirs potentiels, difficultés d'éradication

Italie, Province de Lecce, *Xf pauca*

Début de crise en Europe
octobre 2013



©INRA



©INRA



©INRA

France, Corse, *Xf multiplex*
Été 2015



Situation Européenne, février 2019



Diapositive 8

JR1

Bonjour,

Nous vous informons de l'identification d'un nouveau foyer de *Xylella fastidiosa* (sous-espèce multiplex, différente de celle présente dans les Pouilles et qui n'avait encore jamais été détectée en Italie) en Toscane, région jusqu'à présent indemne.

Quarante plantes ont été trouvées infectées dans le milieu urbain, sur plusieurs espèces ornementales (*Polygala myrtifolia*, *Rosmarinus officinalis*, etc.). Les analyses n'ont pas révélé d'infection d'olivier.

Une enquête intensive dans la zone concernée est en cours afin d'établir une zone délimitée. Les mesures d'éradication prévues aux niveaux national et européen sont appliquées. Les actions de contrôle et d'éradication devraient être facilitées par la conformation géomorphologique du territoire concerné, une presqu'île quasi entièrement entourée par la mer et la lagune et dont la superficie est limitée.

Le BSV

--

Jean-Pierre Rossi; 04/01/2019

Les insectes vecteurs

- Xf n'est rien sans ses vecteurs ...

Les vecteurs nord-américains

- Piqueurs-suceurs de xylème
- Appartiennent à des genres et des groupes différents
- Bien connus, mais connaissance difficilement transposable
- Plusieurs générations par an en région chaude
- pas de transmission de la maladie entre les stades larvaires de l'insecte ni entre les stades larvaires et l'adulte
- Certaines espèces passent l'hiver à l'état adulte
- Un vecteur introduit récemment en CA a eu un impact fort sur la propagation de la maladie (*Homalodisca vitripennis*)

Philaenus spumarius UE => USA

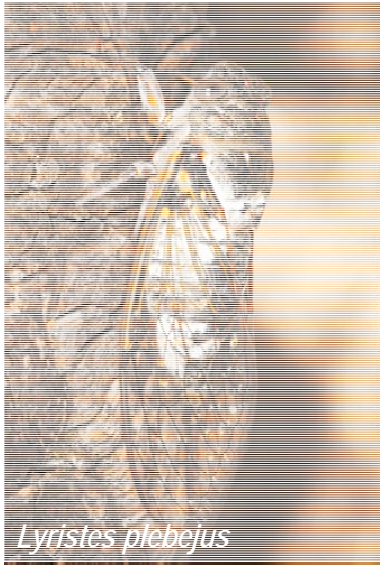
Neophilaenus lineatus UE => USA



Cicadellidae

Les espèces vectrices potentielles en Europe

Cicadidae



4 familles d'Hémiptères (51 spp F, 119 UE)
Aphrophoridae (15 sp F, 29 sp UE)
Cercopidae (7 sp en F et UE)
Cicadellidae (9 sp en F et UE)
Cicadidae et Tibicinidae (20 sp en F et 74 en UE)

- Piqueurs-suceurs de xylème
- Mal connus
- Globalement polyphages
- Pour la plupart communs
- Populations importantes
- Déplacement relativement faible
- En général une génération par an
- Passe l'hiver sous forme d'œufs ou de larves (cigales) (mais réchauffement climatique !)
- Vecteurs avérés : *P. spumarius*,
et (dans une moindre mesure ?)
P. italosignus, *Neophilaenus campestris*

Graphocephala
fennahi USA => UE

Cicadellidae

Aphrophoridae



Cercopidae



Les insectes vecteurs

- La dispersion de Xf est principalement liée aux interactions trophiques entre les plantes et les vecteurs => la compréhension de ces réseaux est capitale pour la gestion de la maladie

Projets passés et en cours

- **Increasing knowledge on *Xylella fastidiosa* and its insect vectors to monitor epidemics and better battle its spread** (funding INRA-DGAL; 2015-2016)

Leader : Christian Lannou (INRA), Juliette Auricoste (DGAL),

Partners M.-A. Jacques (INRA IRHS), S. Santoni (INRA AGAP), S. Soubeyrand (INRA, BIOSP)

- **Harmonized protocol for monitoring and detection of *Xylella fastidiosa* in its host plants and its vectors** (Euphresco Project, 2016-2018)

Leader : Maria Saponari (IPSP, CNR, Italy).

- **XF-ACTORS (H2020, 2017-2021) : *Xylella Fastidiosa* Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy. 2017-2021.**

Leader : Maria Saponari (IPSP, CNR, Italy). Dedicated website : <http://www.xfactorsproject.eu>

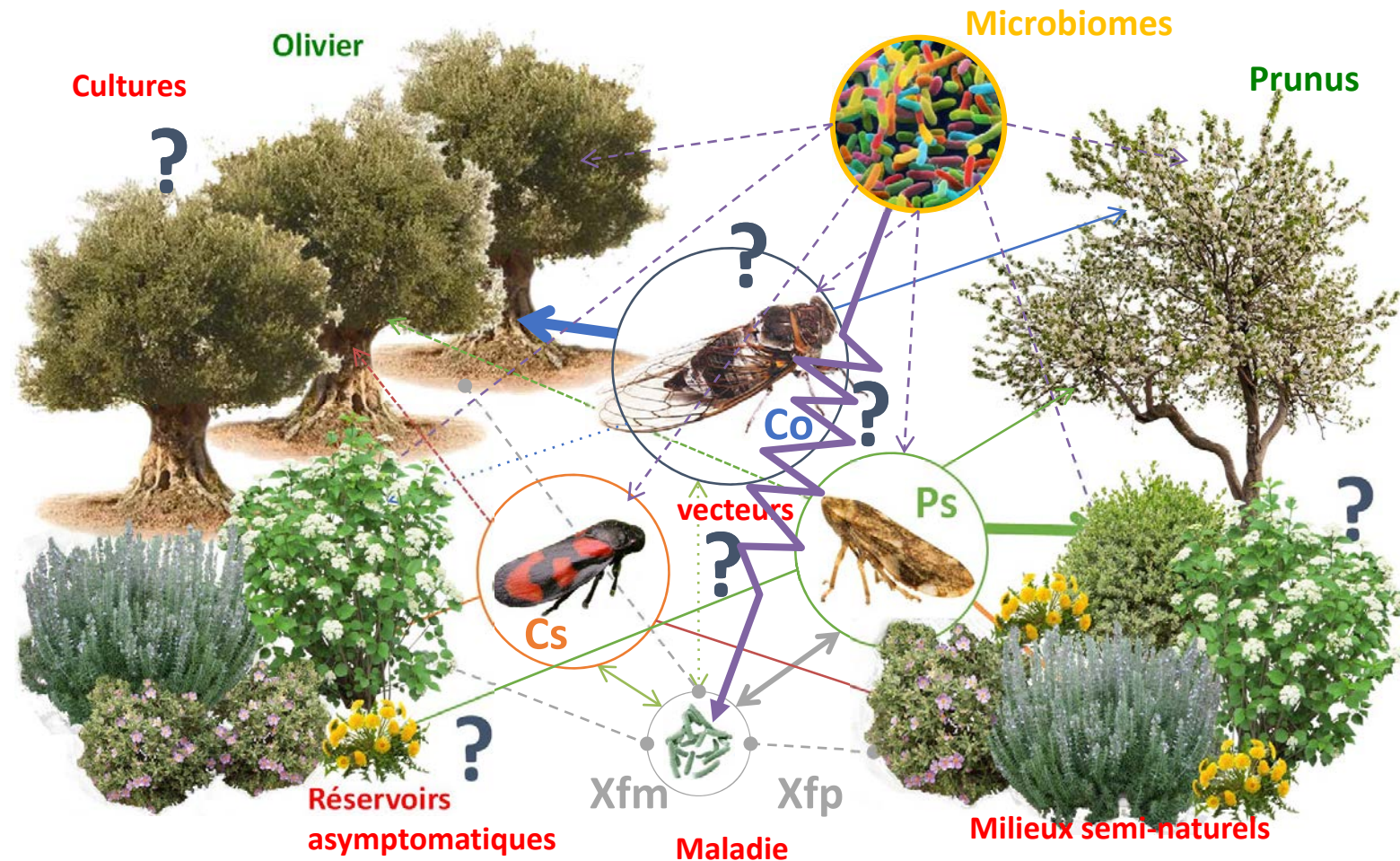
- **Eco-epidemiology of *Xylella fastidiosa* in Corsica** (funding Coll. Territoriale Corse; 2017-2020)

Leaders : F. Casabianca (INRA) & J.-Y. Rasplus, Partners : L. Hugot CNBC, M. Gibernau Univ. Corse

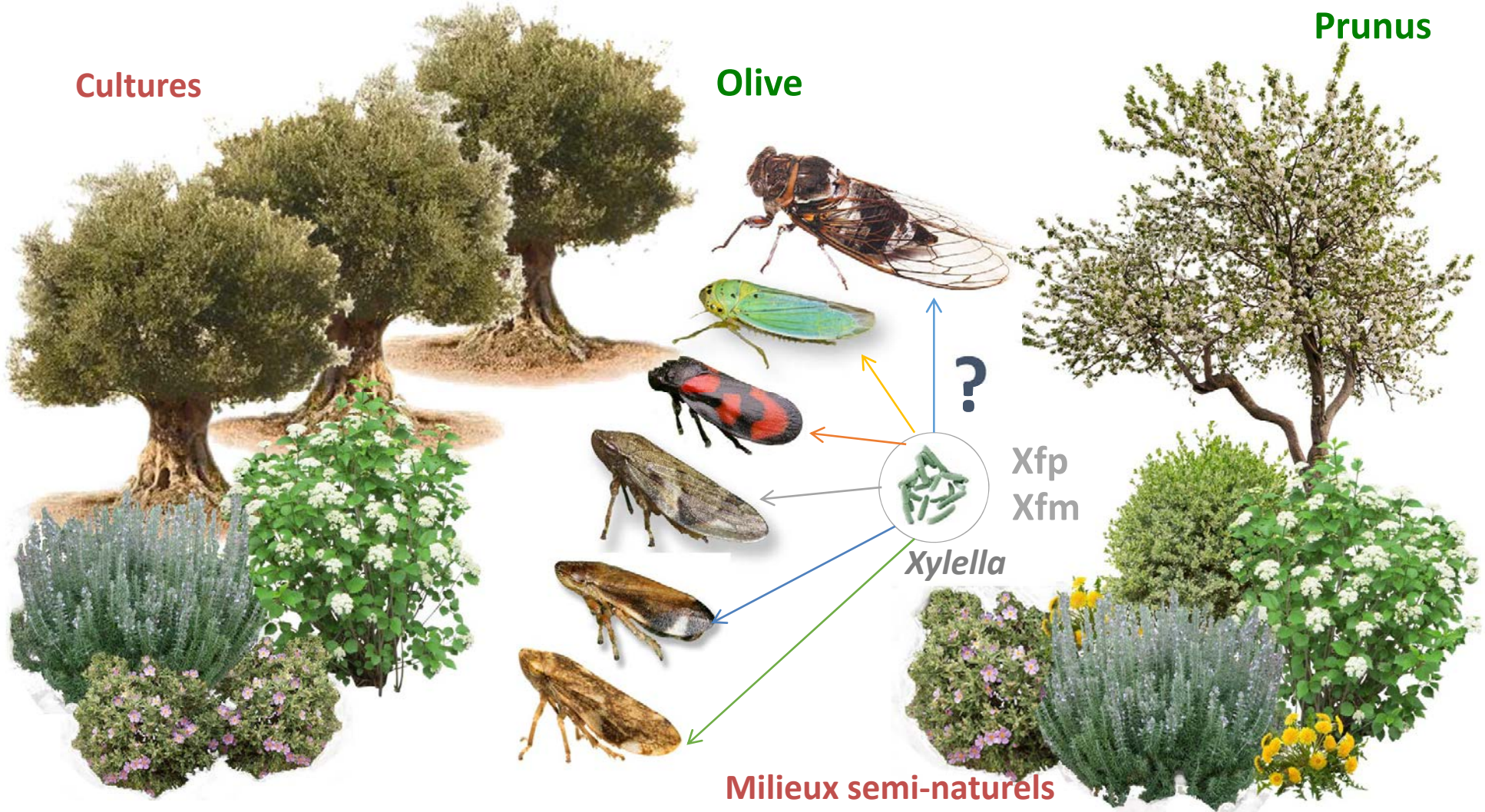


Objectif à terme

- Replacer les vecteurs au cœur du système
- Caractériser les réseaux d'interactions vecteurs - *Xf* - plantes d'alimentation pour mieux comprendre la dynamique de la maladie et proposer des moyens de lutte



Quelles vecteurs portent Xf, quelle ssp?
Quelle proportion d'individus, portant la/les ssp de Xf ?
La communauté vectrice de Xf change-elle au cours du temps ? et géographiquement ?

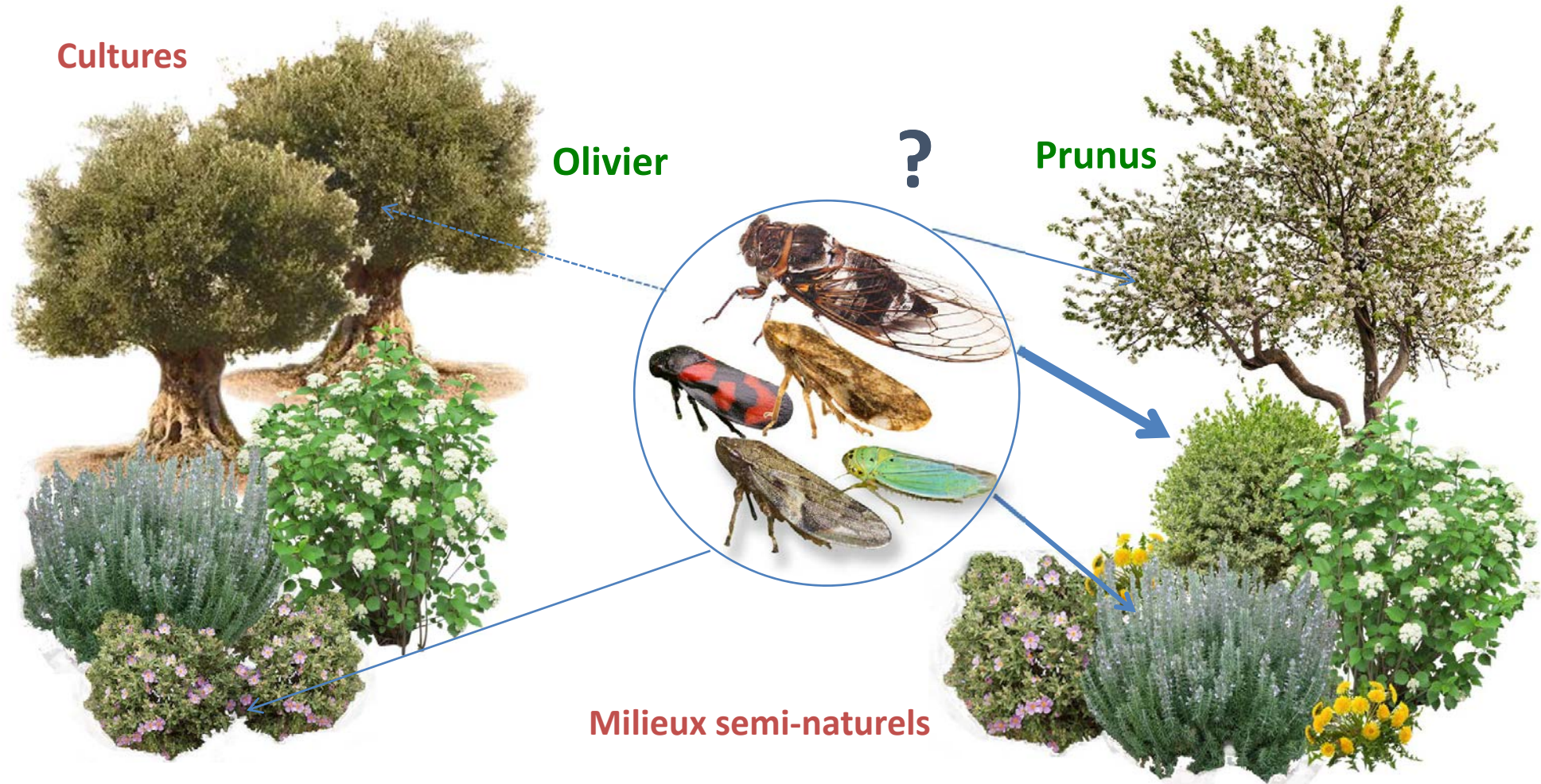


Sur quelles plantes s'alimentent préférentiellement les vecteurs ?

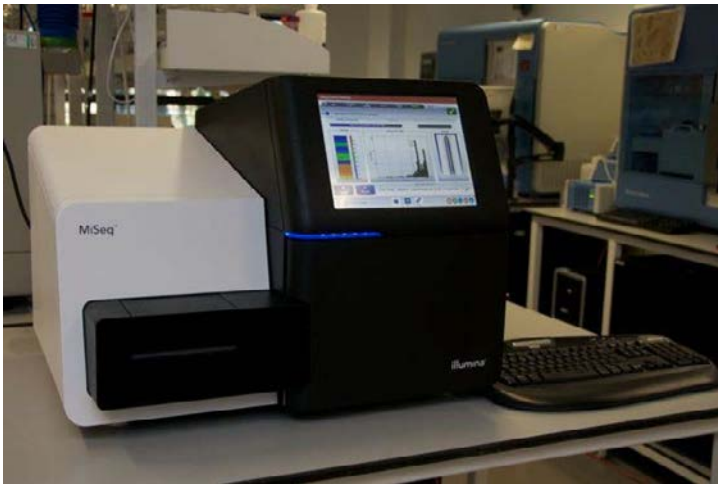
Quelles sont les composés attractifs ou répulsifs pour les vecteurs, émis par les plantes?

Comment varient les préférences alimentaires des vecteurs entre localités ?

Comment la flore locale influence la présence de vecteurs ? La diffusion de Xf ?



Comment caractériser les réseaux d'interactions entre vecteurs, Xf et les plantes d'alimentation ?



- 1 marqueur pour l'identification du vecteur
- 1-2 marqueurs pour identifier la plante d'alimentation
- Les 7-9 marqueurs diagnostiques de *Xylella* (MLST)



ADN vecteur



ADN microbiome



ADN *Xylella*



ADN plante
ingérée

Plusieurs centaines d'individus sur une douzaine de marqueurs.
On peut savoir qui est qui, qui porte quoi, qui a mangé quoi ...

Détection et caractérisation de *Xf* dans les vecteurs qui porte *Xf* et quelle sous-espèce / souche ?



⇔ Chercher une ou quelques aiguilles dans une botte de foin. Le foin étant l'ADN de l'insecte

Avec 2 impératifs :

- 1- éviter les faux négatifs**
- 2- éviter les faux positifs**

Expérience pilote

Quoi ? 11 populations de *Philaenus spumarius* en Corse

Question : Existe t-il des variations saisonnières (fin du printemps / fin d'automne) de prévalence de la bactérie dans les populations d'insectes ?



11 pop (32 ind/pop)
4 pop juin 2016
4 pop oct 2016
3 pop juin + oct 2016
→ 448 spécimens



-Protocole d'extraction robotisé adapté pour augmenter le rendement en ADN bactérien tout en réduisant l'impact des inhibiteurs de PCR contenus dans les insectes.

-Comparaison qPCR (méthode "officielle"; 1 sonde fluorescente 2 amorces avec calcul Ct seuil)
vs nested PCR + séquençage gènes de ménage

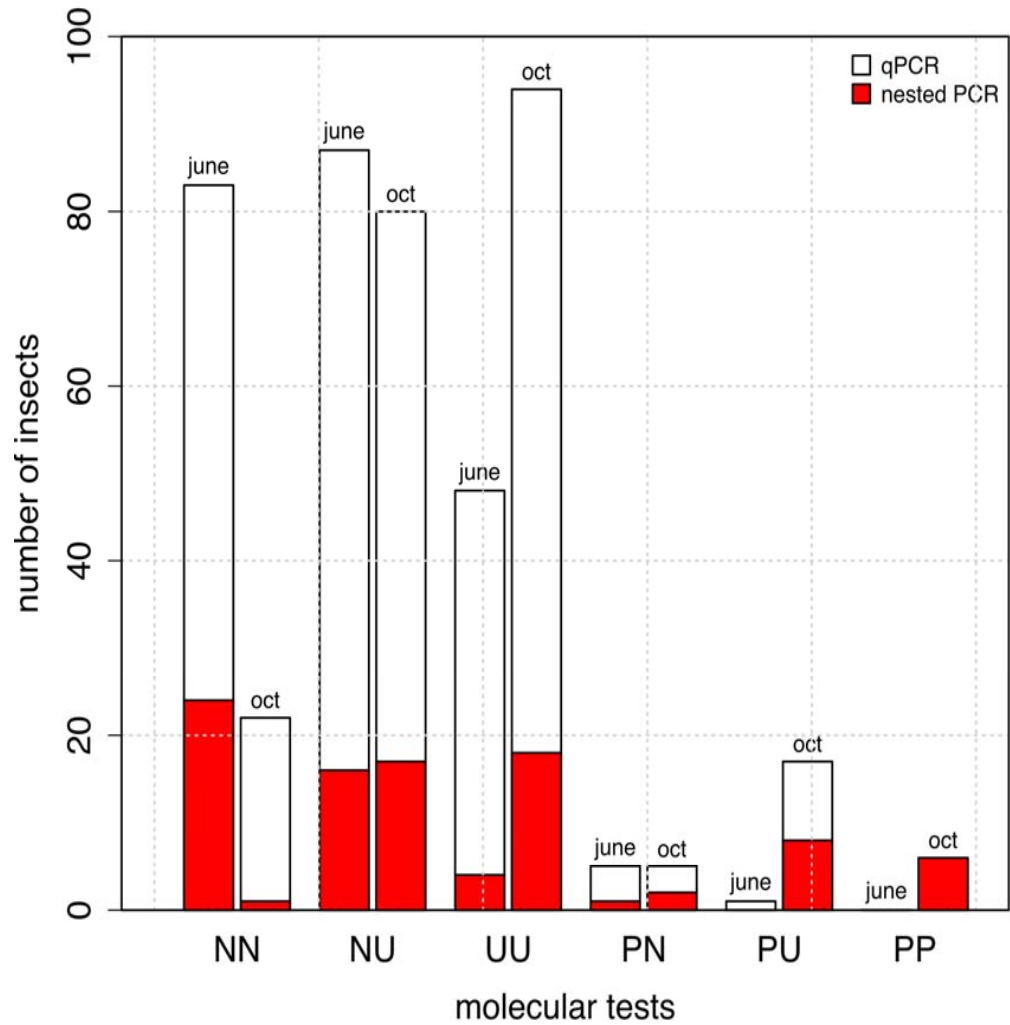
SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

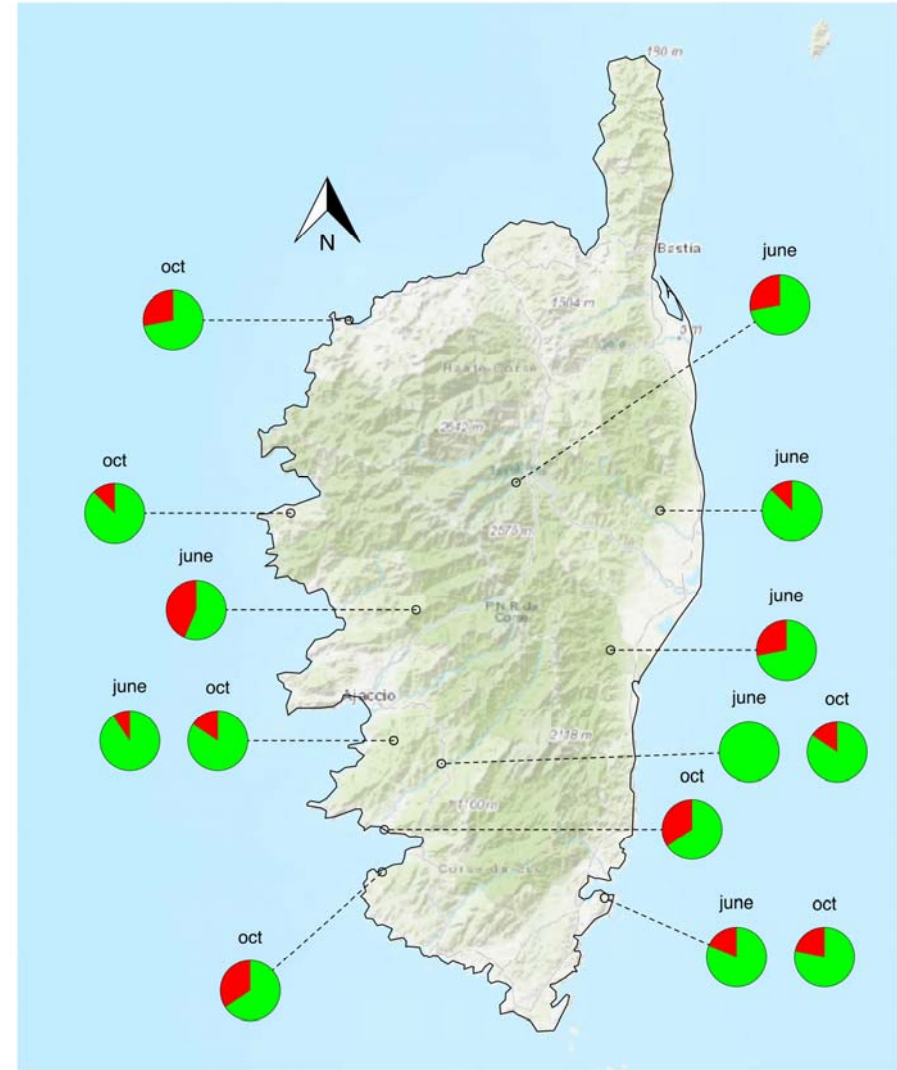
Using insects to detect, monitor and predict the distribution of *Xylella fastidiosa*: a case study in Corsica

Astrid Cruaud¹, Anne-Alicia Gonzalez^{1,2}, Martin Godefroid¹, Sabine Nidelet¹, Jean-Claude Streito¹, Jean-Marc Thuillier¹, Jean-Pierre Rossi¹, Sylvain Santoni² & Jean-Yves Rasplus¹

Résultats



qPCR versatile sous-estime la prévalence de *Xf*



Toutes les stations contaminées, y compris dans zones non contaminées, prévalence de 20%

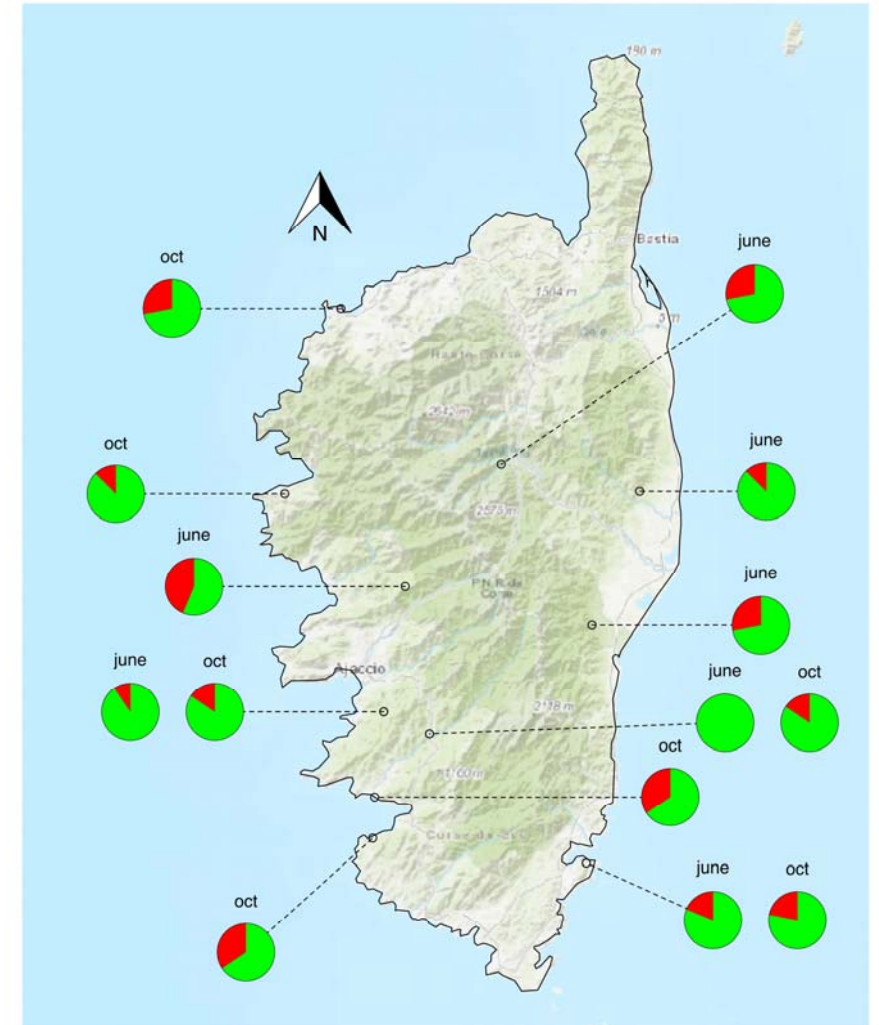
Plusieurs faisceaux de présomption pour une colonisation ancienne de Xf

1. 100 % des stations, prévalences 20% en moyenne

2. Modèle avec compartiment caché : introduction vers 1985 (1978-1993) et prévalence plus forte (Soubeyrand et al., 2018)

3. Approche de datation basée sur les données génomiques (Denancé N., Rieux A. and Jacques M.- A., in prep)

=> Colonisation ancienne (50 ans ou +?), expansion dans toute la Corse



SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Using insects to detect, monitor and predict the distribution of *Xylella fastidiosa*: a case study in Corsica

Astrid Cruaud¹, Anne-Alicia Gonzalez^{1,2}, Martin Godefroid¹, Sabine Nidelet¹, Jean-Claude Streito¹, Jean-Marc Thuillier¹, Jean-Pierre Rossi¹, Sylvain Santoni¹ & Jean-Yves Rasplus¹



New Phytologist Trust



Access by INRA Institut National de la Recherche Agronomique

Search

Inferring pathogen dynamics from temporal count data: the emergence of *Xylella fastidiosa* in France is probably not recent

Samuel Soubeyrand ✉, Pauline de Jerphanion, Olivier Martin, Mathilde Saussac, Charles Manceau, Pascal Hendrikx, Christian Lannou

Résultats

Pour la première fois, séquençage des 7 marqueurs diagnostiques de *Xf* à partir d'un insecte

MAIS

Impossible de séquencer tous les marqueurs pour les insectes faiblement contaminés et donc de donner une identification définitive conforme aux standards internationaux

DE PLUS

Nécessité de s'assurer que les négatifs sont bien négatifs

Nécessité de faire une pré-détection avant de séquencer (éviter de séquencer des échantillons négatifs)

On ne peut pas mettre tout l'ADN de l'insecte dans une seule manip [10% insecte => stochasticité des résultats]

Développements en cours

qPCR 2 sondes avec fluorescence différent, 2 réplicats par échantillon (4 Ct par échantillon) [0.45€ / puit]

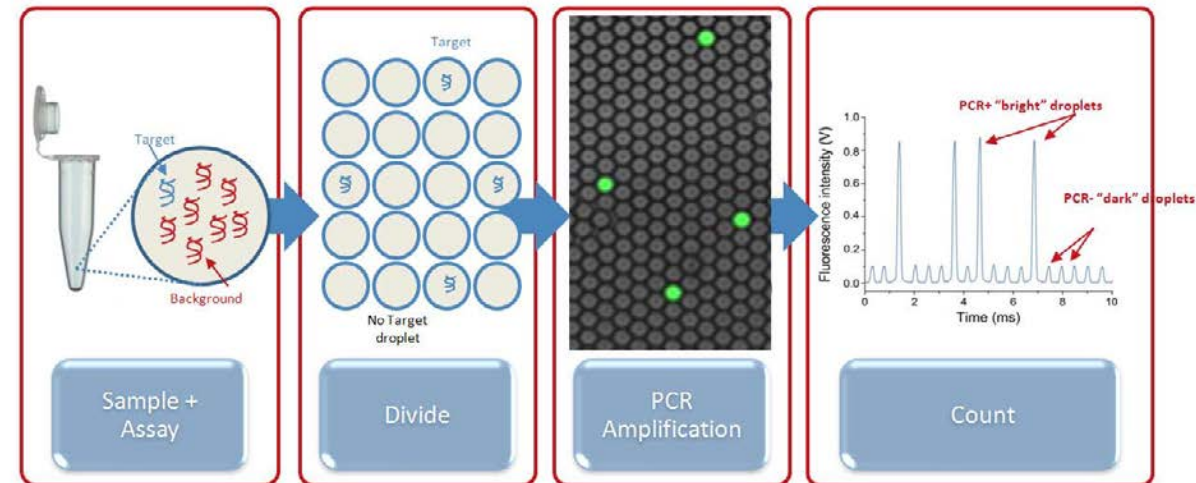
⇒ **Détection**

PCR en goutte pour subdiviser le milieu réactionnel, avec 2 sondes couleur échantillon positif = combinaison des 2 fluorescences
[6€ / puit ; ca 25,000 gouttes / échantillon]

[Limit of Blank = 2 gouttes; Limit of Detection cible synthétique]

⇒ **Confirmation pour échantillon en limite de qPCR**

⇒ **Quantification**



Capture des gènes de ménage

=> **caractérisation**

Capter les gènes de ménage et l'ADN des plantes ingérées

1) Design de sondes pour capturer ca 1400 bp du gène (rbcl)

- Point de départ : 87 360 séquences (NCBI), 443 familles, 38 052 espèces
- réduit à 187 familles de plantes européennes
- Nettoyage des séquences (non codantes, outliers, etc.)
- Filtration pour garder les séquences avec des divergences > 95%
- Probes de 100bp avec un recouvrement de 50% entre chaque → 4,972 probes

2) Design de sondes de 100 bp pour couvrir les 7 gènes du MLST de Xf

511 probes x 10x

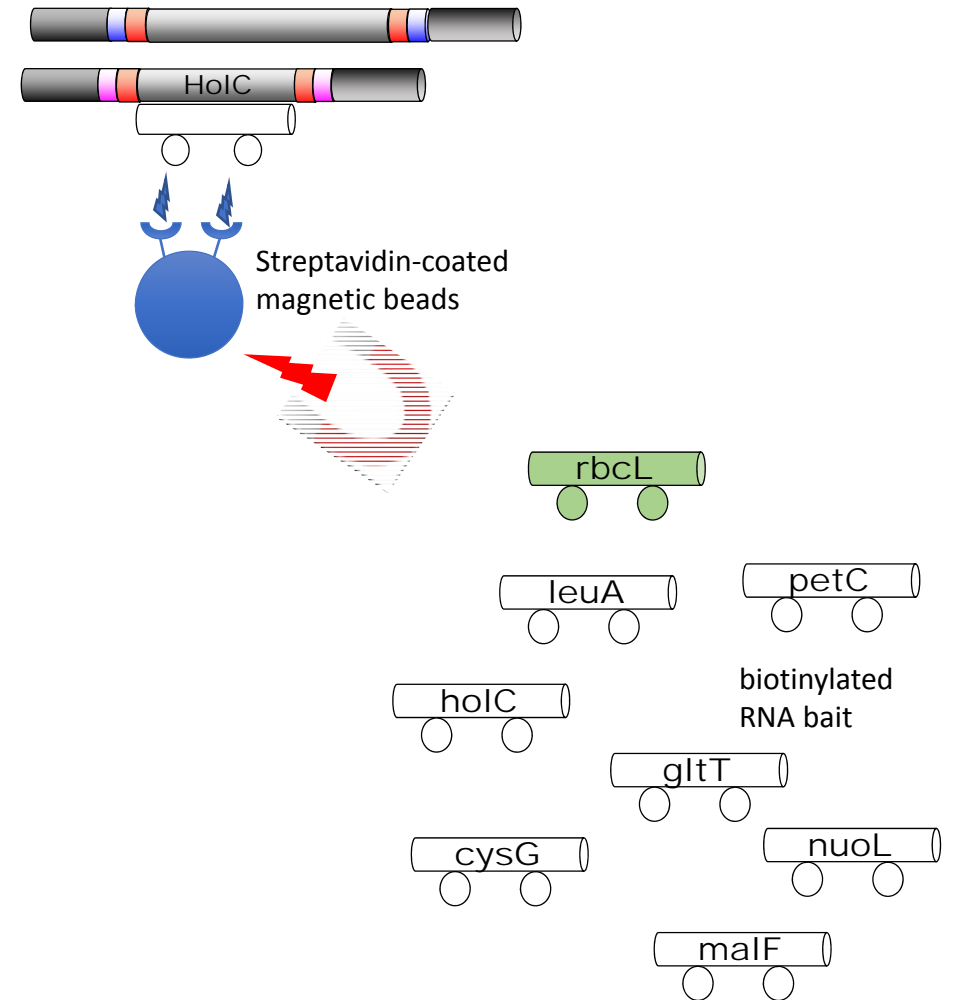
3) Test sur un sous-échantillonnage (8)

Résultats prometteurs : tous les loci du MLST sont capturés,

Assignation de rbcl aux espèces de plantes attendus

4) Test sur un échantillonnage plus important

En cours ...



Nouveaux outils, nouvelles questions

Pour inférer les réseaux trophiques 3 questions préliminaires doivent être adressées :

- *Quels insectes se nourrissent sur quelle(s) plantes ?*
- *Quels insectes / plantes portent Xf ?*
- *De quelle(s) souches s'agit-il ?*

→ Nous disposerons sous peu des moyens techniques pour le faire

→ Qui, couplés à des observations de terrain, vont nous permettre d'adresser de nouvelles questions

Nouveaux outils, nouvelles questions

GESTION :

- Comment les préférences alimentaires des vecteurs influencent la transmission de *Xf* dans les communautés de plantes ?
- Quelles sont les entités clefs pour l'intégrité des réseaux qui pourraient être ciblées pour le contrôle de *Xf* ?
- Quelles conditions réduisent la propagation de *Xf* et/ou facilitent la guérison des plantes ?
- **Hypothèse:** On devrait trouver plus de vecteurs (diversité / abondance) dans des milieux humides ; les plantes y seront plus irriguées et les vecteurs généralistes devraient s'y nourrir mieux et plus longtemps, pourtant le flux de sève devrait limiter la formation de bouchons bactériens : ie dispersion efficace sans symptôme apparent

ANTICIPATION :

- Trouver des indicateurs biotiques / abiotiques pour anticiper l'incidence de *Xf* d'une année sur l'autre
- Prédire comment *Xf* pourrait se répendre dans un écosystème dont on connaît la composition en plantes / vecteurs, le paysage et les conditions climatiques.

Nouveaux outils, nouvelles questions

Dispositif experimental :

Suivi de couples habitats naturels /agro-systèmes pour y étudier la propagation de Xf. Description des parcelles : composition des communautés de plantes, caractéristiques pédologiques, hydrologiques, conditions climatiques (temperature, pluie, vent).

Quatre fois par an (effet saison) :

- ➔ recenser la présence de symptômes sur les plantes
- ➔ échantillonner les plantes et les vecteurs pour une caractérisation à haut-débit des interactions trophiques et des sous-espèces / souches de Xf présentes
- ➔ estimation de l'abondance des vecteurs

Mise en place d'un premier dispositif en Corse, pour acquérir des premières données et ajuster le tir ...

Questions étudiées au sein du dispositif corse

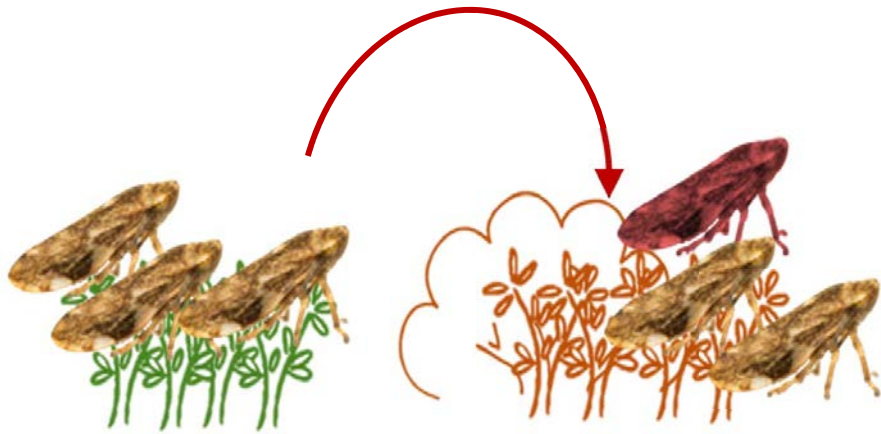


Quelle abondance de
porteurs potentiels ?

dénombrement en temps
limité de la population de
P. spumarius

Questions étudiées au sein du dispositif corse

acquisition de Xf lors de
l'alimentation sur plantes
contaminées



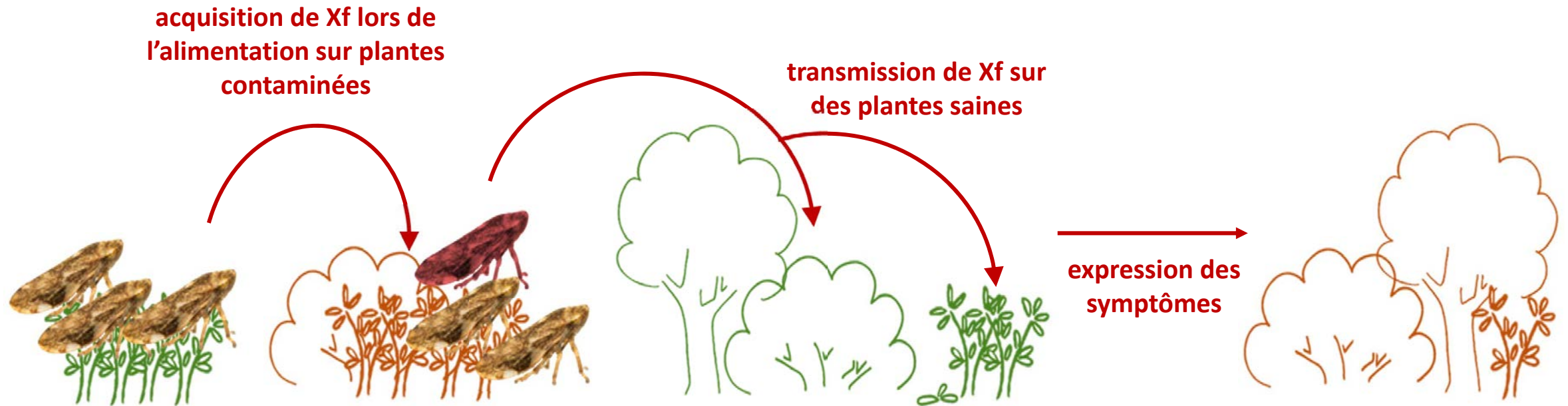
Quelle abondance de
porteurs potentiels ?

dénombrement en temps
limité de la population de
P. spumarius

Quelle abondance de
vecteurs potentiels ?

prévalence de Xf dans les
populations de
P. spumarius

Questions étudiées au sein du dispositif corse



Quelle abondance de porteurs potentiels ?

dénombrement en temps limité de la population de *P. spumarius*

Quelle abondance de vecteurs potentiels ?

prévalence de Xf dans les populations de *P. spumarius*

Quelles sont les plantes porteuses de Xf ?

interprétation des symptômes

Mesures réalisées sur le dispositif corse

Description abiotique de la placette

géologie, pédologie, altitude,
exposition, pente, conditions
météo etc...



Mesures réalisées sur le dispositif corse

Description abiotique de la placette

géologie, pédologie, altitude, exposition, pente, conditions météo etc...



Relevé botanique :
% de recouvrement de chaque espèce végétale par strate

% de recouvrement de ***C. monspeliensis***
% vivant et % mort de **végétation morte**

évaluation qualitative de la **turgescence de la végétation** (note 0:3)

Mesures réalisées sur le dispositif corse

Description abiotique de la placette

géologie, pédologie, altitude, exposition, pente, conditions météo etc...

VECTEUR
Philaenus spumarius



Dénombrement des individus/temps limité sur la placette :

larves : visuellement (baves)
adultes : filet fauchoir

Prévalence de la bactérie dans les population de vecteurs (détection moléculaire) prélevés à proximité de la placette
P. spumarius + autres vecteurs potentiels prélevés

Relevé botanique :
% de recouvrement de chaque espèce végétale par strate

% de recouvrement de *C. monspeliensis*
%vivant et %mort de **végétation morte**

évaluation qualitative de la **turgescence de la végétation** (note 0:3)

Mesures réalisées sur le dispositif corse

Description abiotique de la placette

géologie, pédologie, altitude, exposition, pente, conditions météo etc...

Évaluation qualitative de la gravité des symptômes de la maladie sur quelques espèces d'intérêt

Olea europaea, *Quercus ilex*, *Myrtus communis* et *Arbutus unedo* et sur la végétation globale (note 0:4)



VECTEUR
Philaenus spumarius



Dénombrement des individus/temps limité sur la placette :

larves : visuellement (baves)
adultes : filet fauchoir

Relevé botanique :

% de recouvrement de chaque espèce végétale par strate

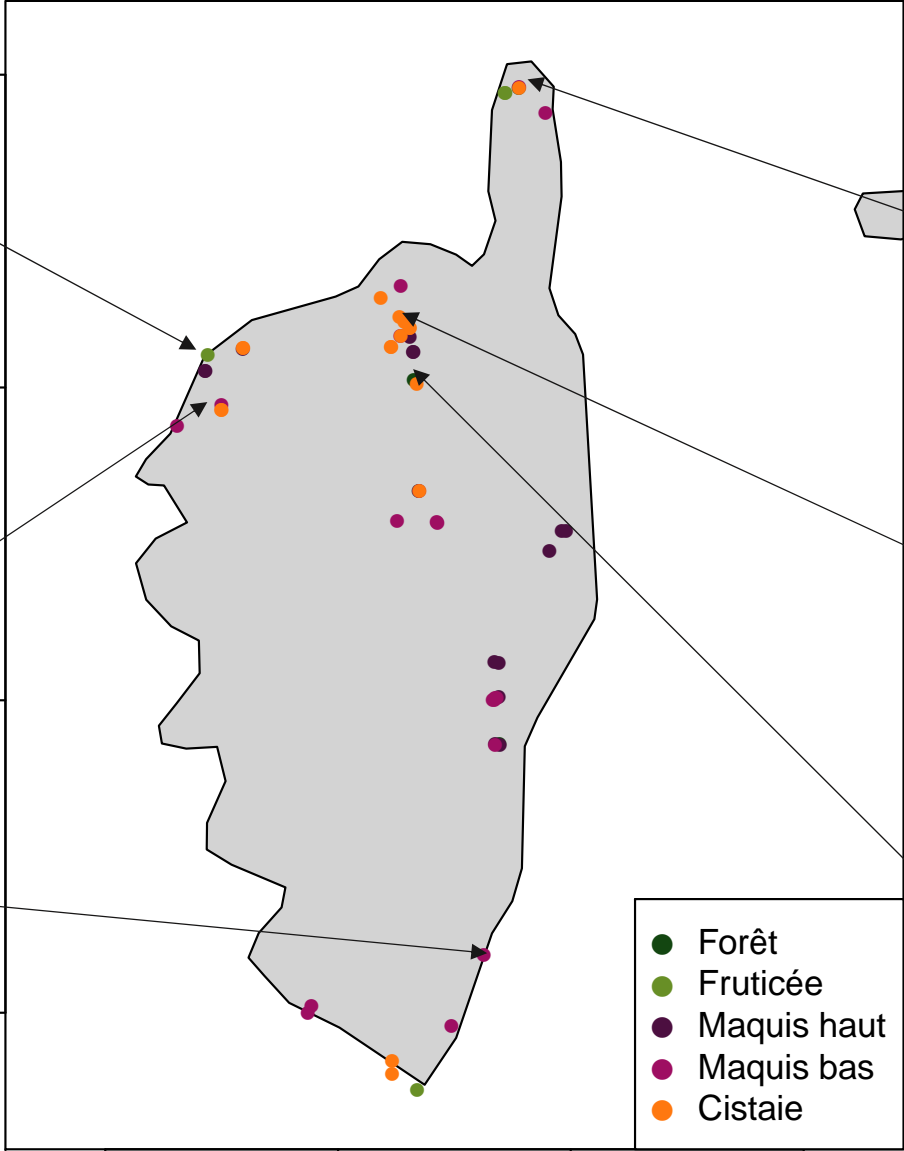
% de recouvrement de *C. monspeliensis*
% vivant et % mort de **végétation morte**

évaluation qualitative de la **turgescence de la végétation** (note 0:3)

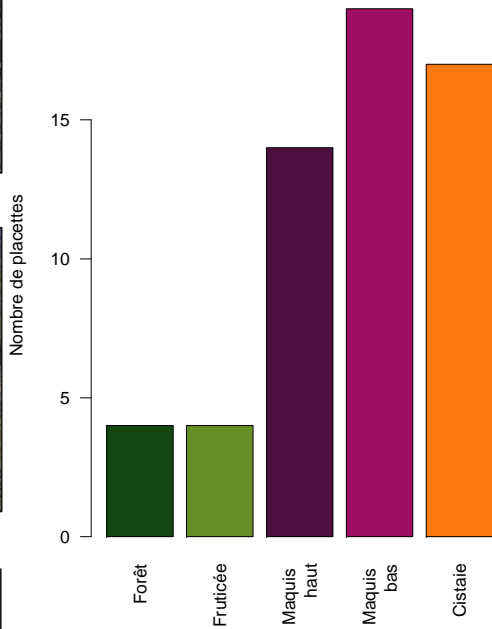
Prévalence de la bactérie dans les population de vecteurs (détection moléculaire) prélevés à proximité de la placette
P. spumarius + autres vecteurs potentiels prélevés

Localisation des placettes d'étude & diversité de situations

64 placettes, suivies 3x par an depuis 2018

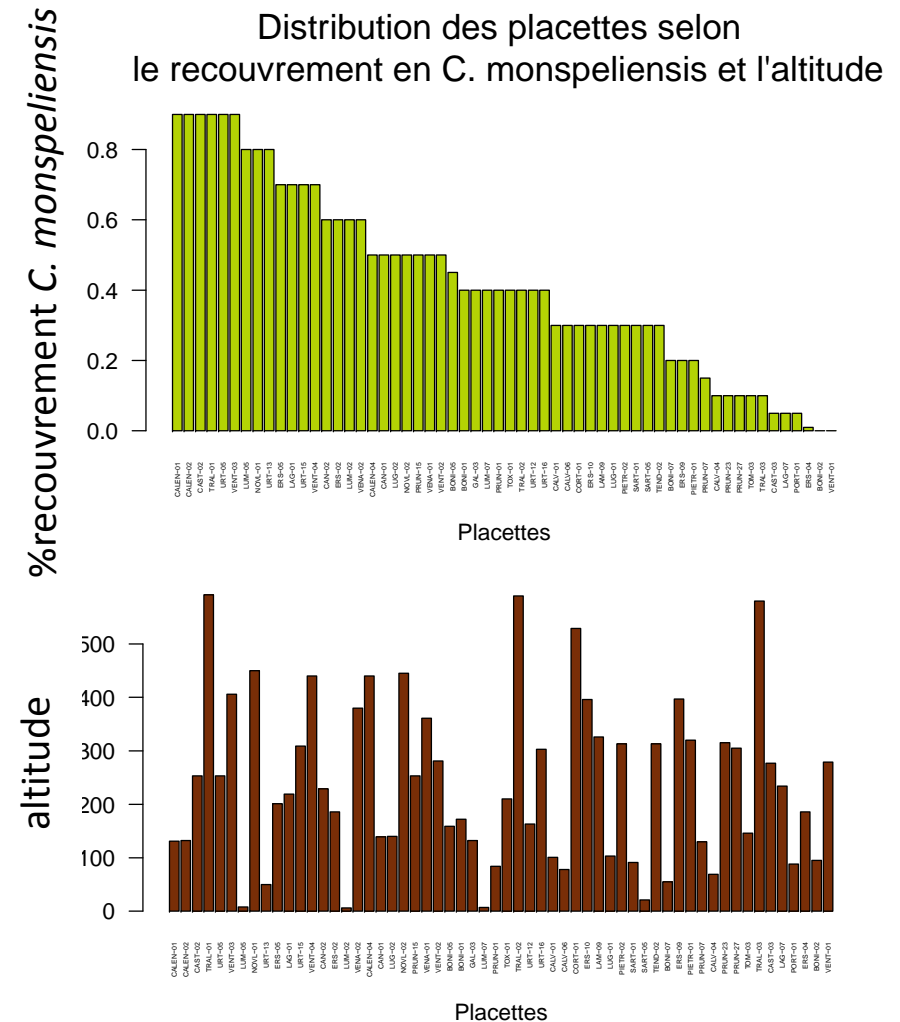


Distribution des types de végétation dans le réseau



Critères de sélection des placettes du réseau corse

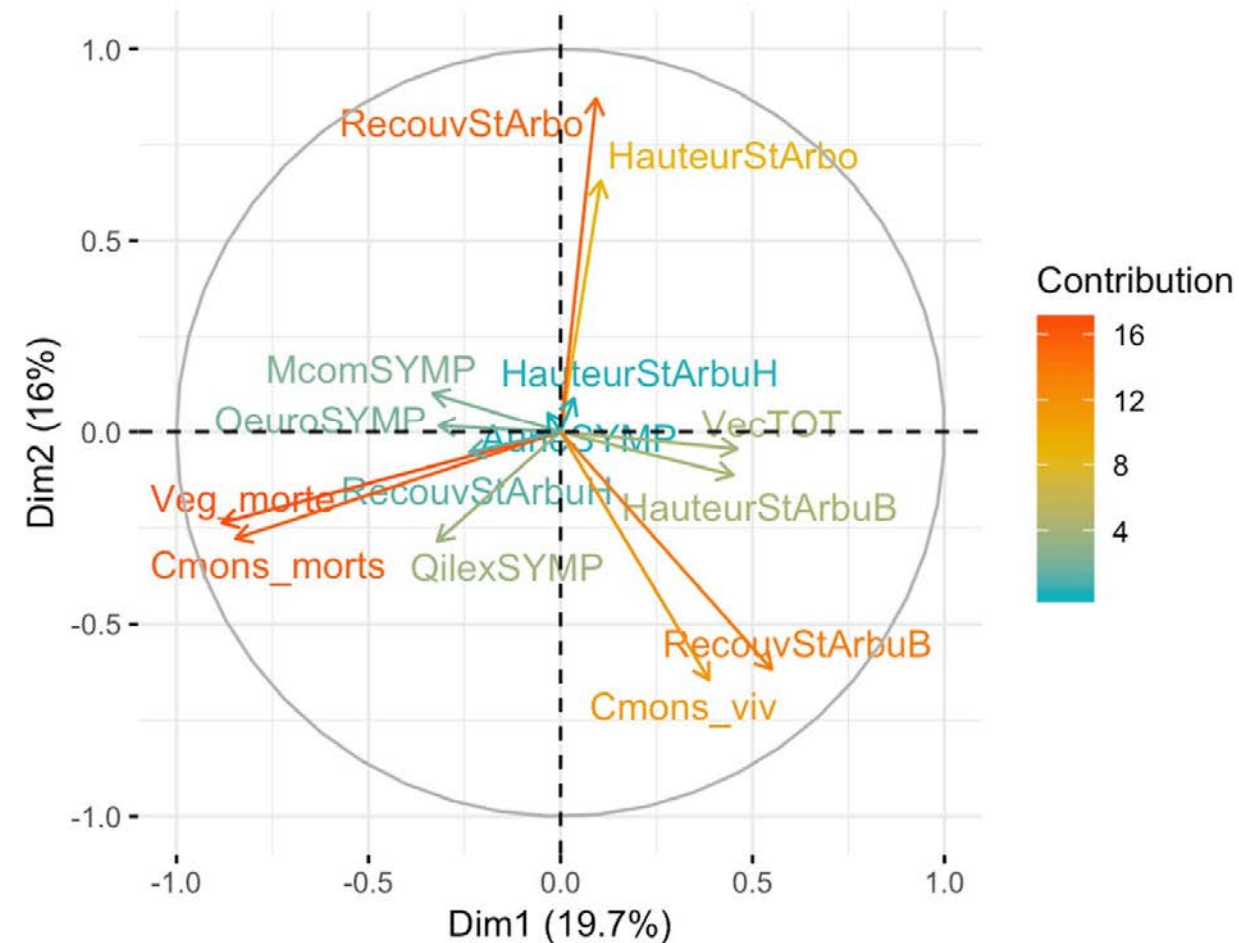
- **selon un gradient de recouvrement de la végétation en ciste**
(hypothèse : forte influence du recouvrement en ciste sur la densité de *Philaenus*)
- **répartition sur le territoire corse**
(hypothèse : la densité de vecteurs et l'expression de symptômes sont corrélés aux conditions pédoclimatiques)



Analyse triadique partielle sur les 3 jeux de données du printemps/été/automne 2018

→ identifier une structure commune entre les 3 saisons

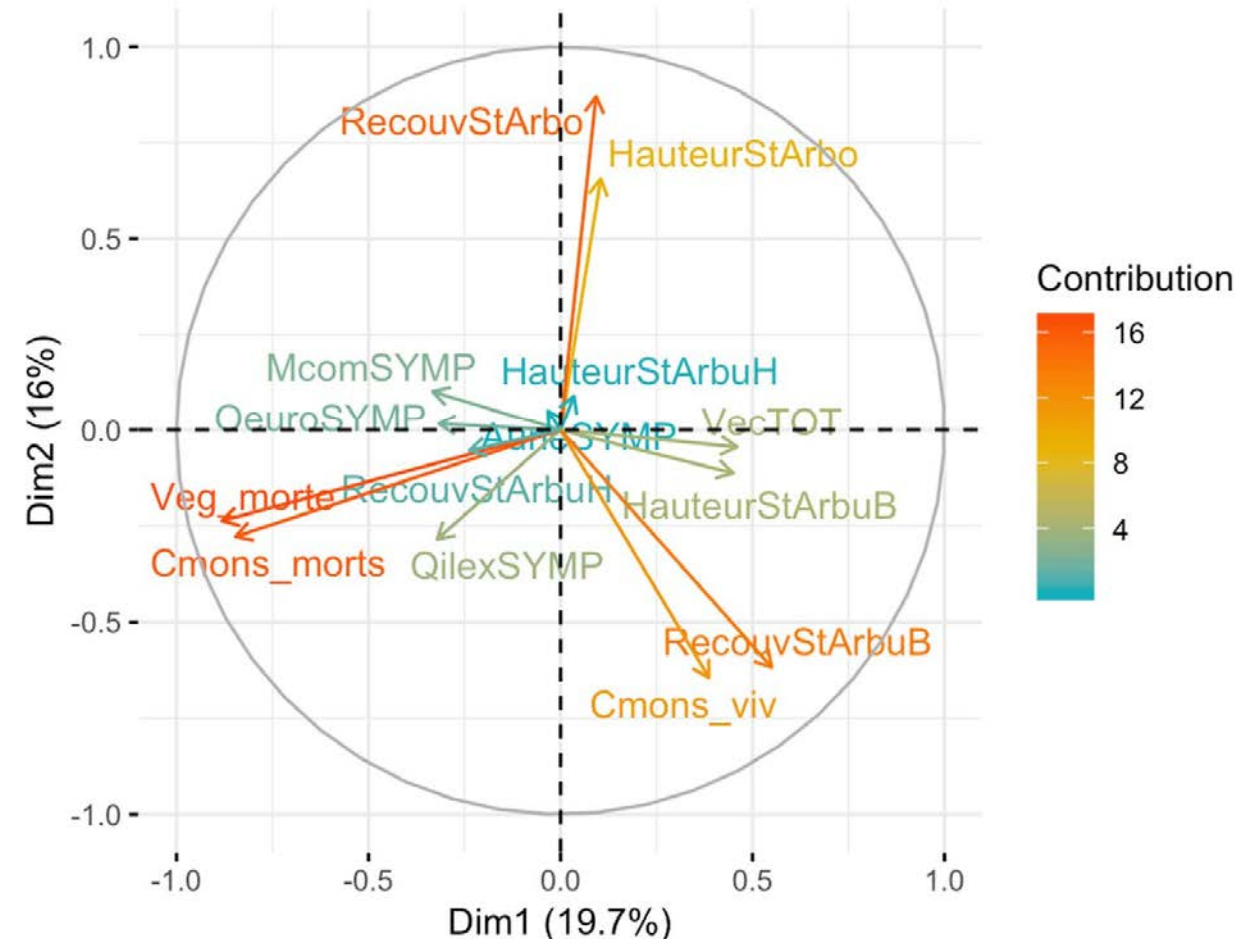
Graphique des variables
2018



Analyse triadique partielle sur les 3 jeux de données du printemps/été/automne 2018

→ identifier une structure commune entre les 3 saisons

Graphique des variables
2018



L'altitude (invariante) n'a pas d'effet structurant sur le jeu de données

Distinction des placettes :

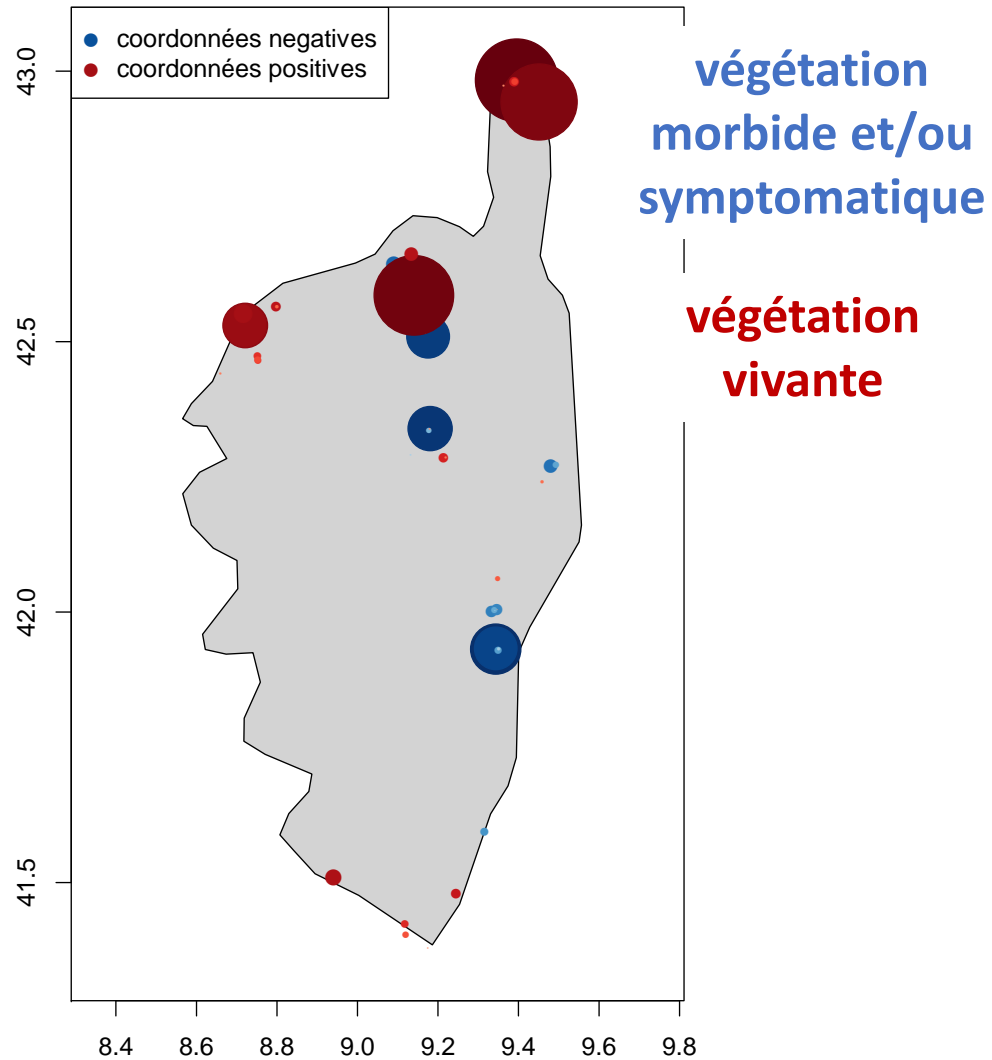
- végétation **morbide et symptomatique** vs. végétation **saine avec *C. monspeliensis* vivant**
- **forêt vs. maquis/cistaie**

Indépendance entre abondance de *P. spumarius* et

- **structure de la végétation** ou
- **état global de la végétation**

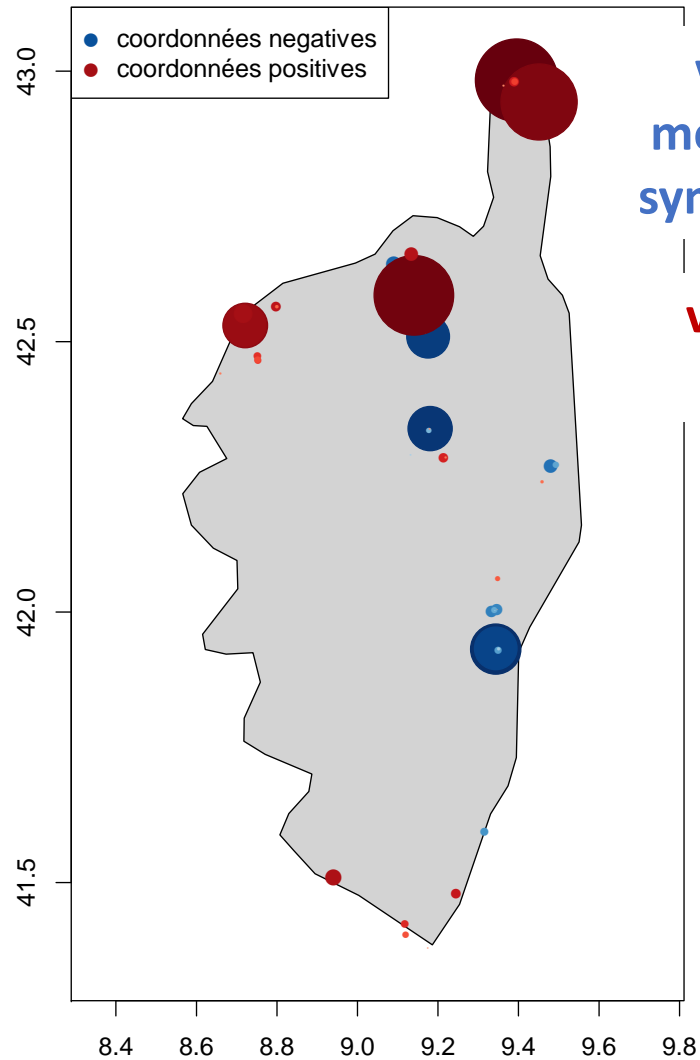
Représentation géographique des résultats de l'ATP

Distribution des placettes selon leurs coordonnées
sur la dimension 1 de l'ATP



Représentation géographique des résultats de l'ATP

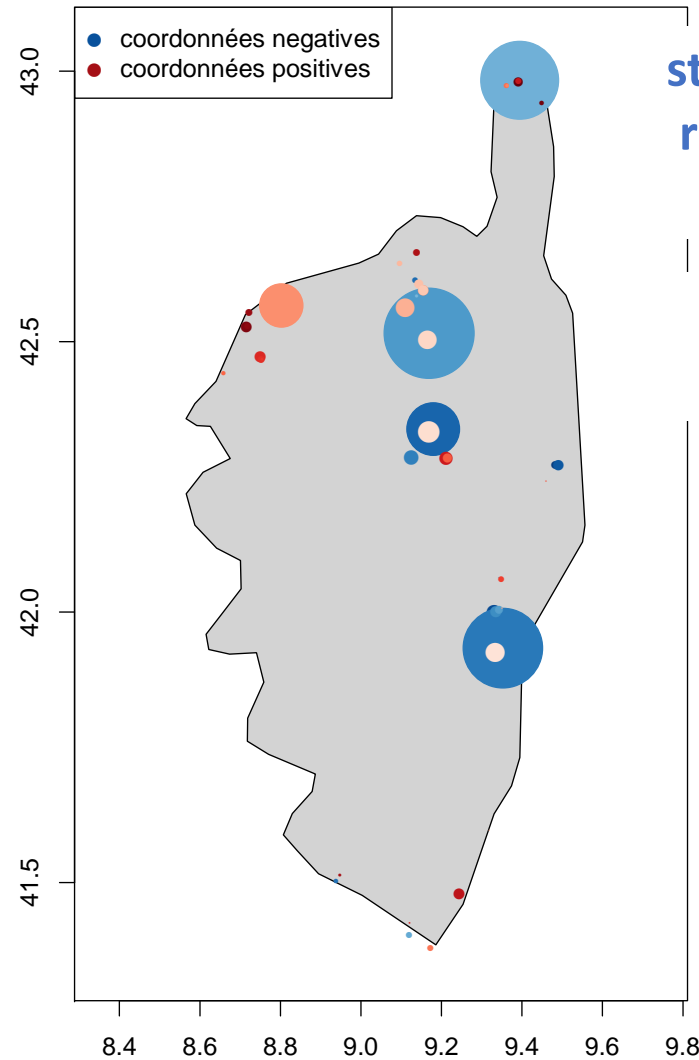
Distribution des placettes selon leurs coordonnées sur la dimension 1 de l'ATP



**végétation
morbide et/ou
symptomatique**

**végétation
vivante**

Distribution des placettes selon leurs coordonnées sur la dimension 2 de l'ATP

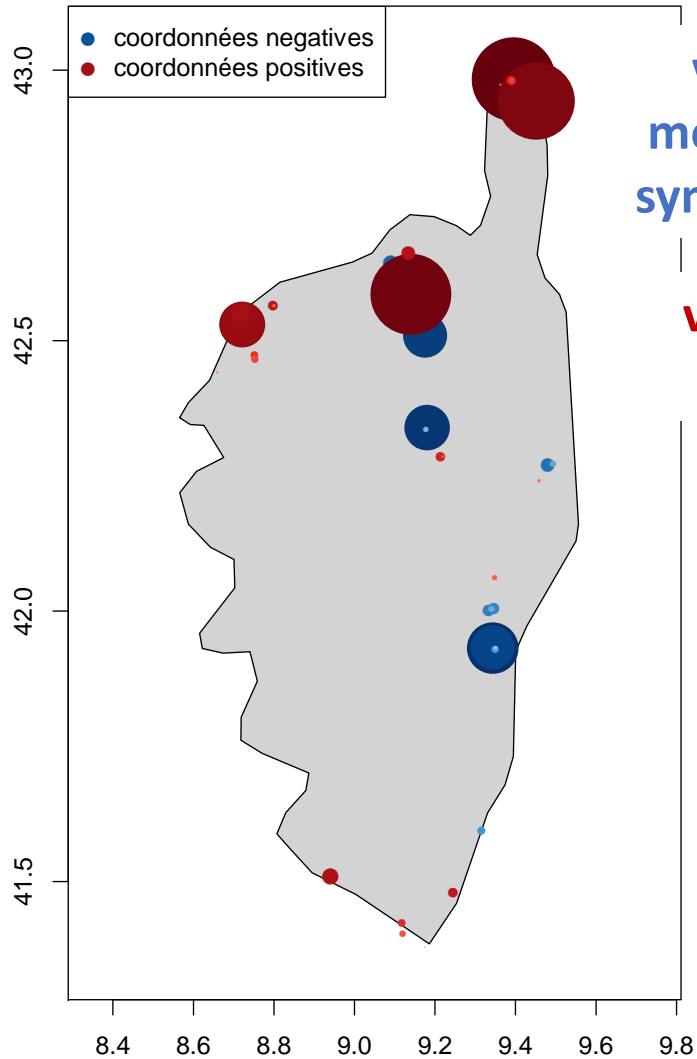


**strate arbustive basse
recouvrante riche en
*C. monspeliensis***

**strate arborée
importante**

Représentation géographique des résultats de l'ATP

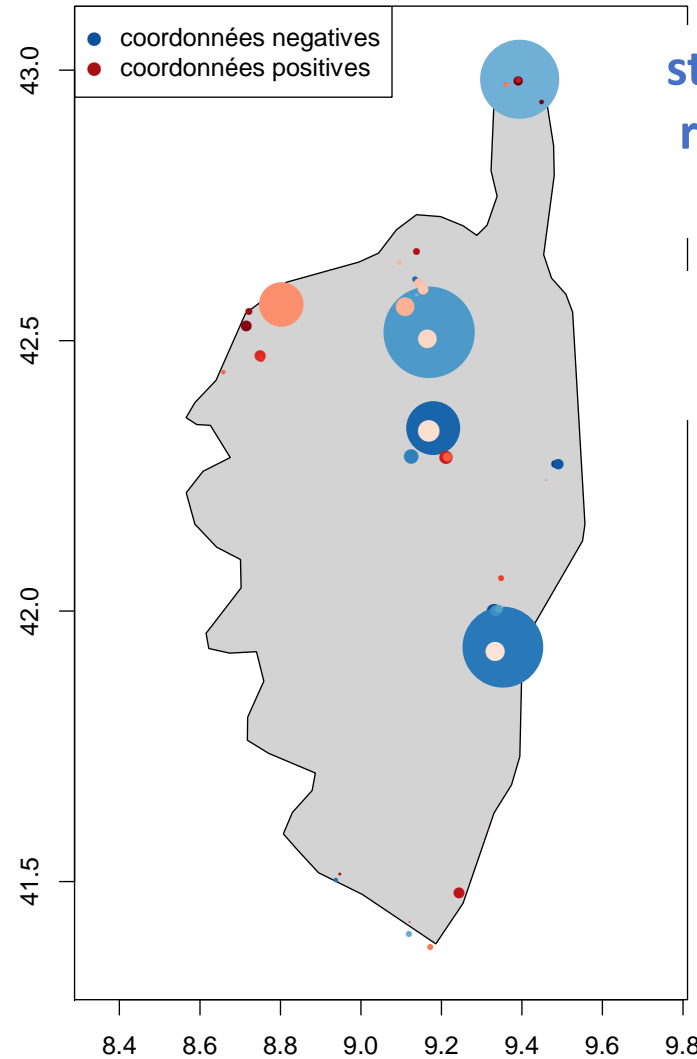
Distribution des placettes selon leurs coordonnées sur la dimension 1 de l'ATP



**végétation
morbide et/ou
symptomatique**

**végétation
vivante**

Distribution des placettes selon leurs coordonnées sur la dimension 2 de l'ATP

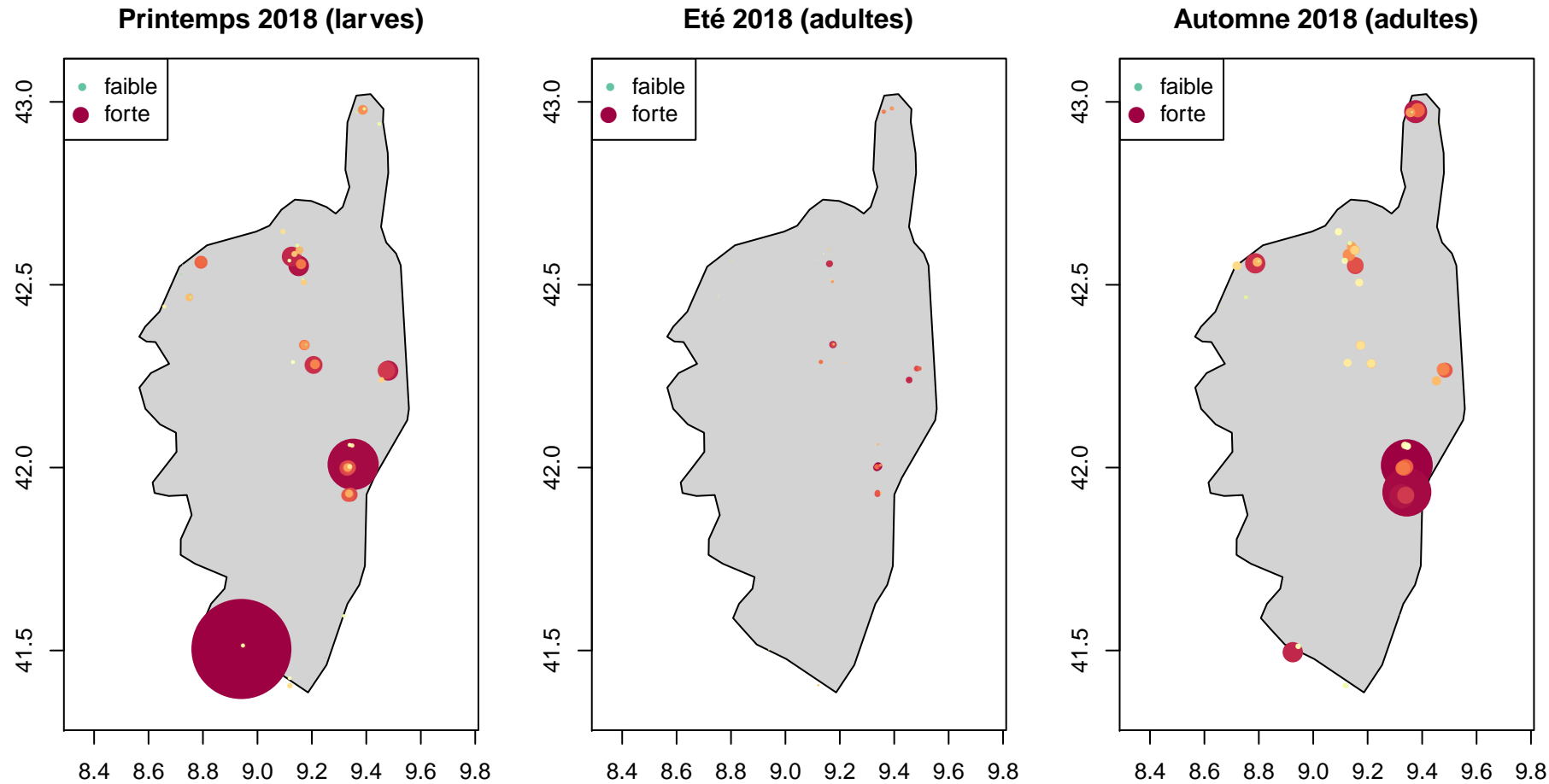


**strate arbustive basse
recouvrante riche en
*C. monspeliensis***

**strate arborée
importante**

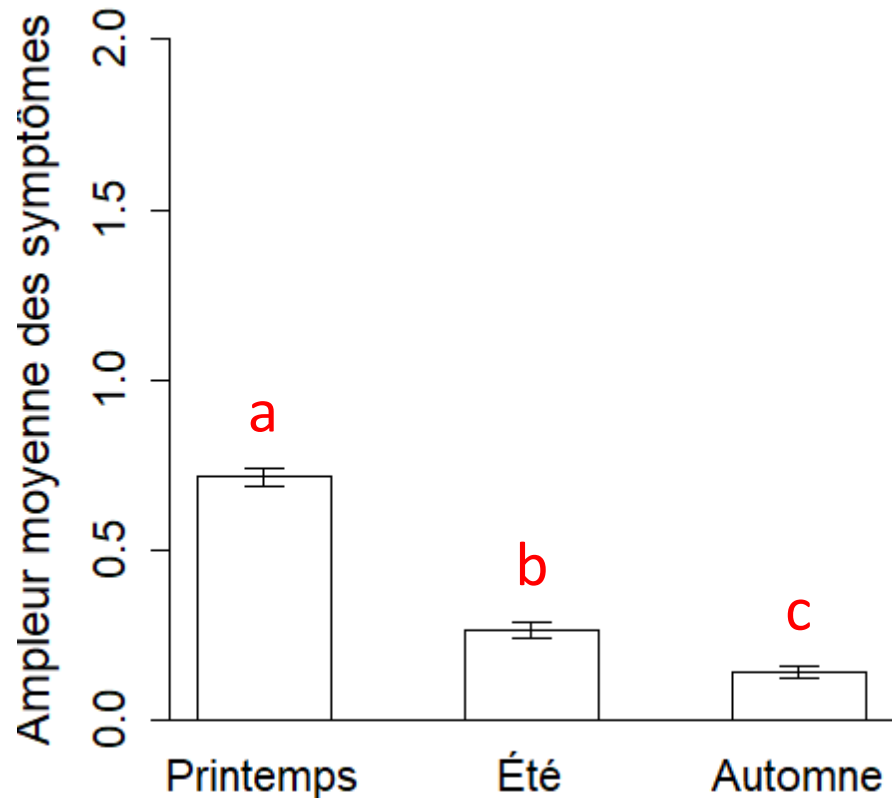
→ pas de structuration
géographique des
données

Abondance de *P. spumarius* dans le réseau de placettes



- **Plaine orientale particulièrement riche en *P. spumarius*** : humidité plus importante ?
- **Fluctuations saisonnières** : printemps et été très secs, automne très humide ?
- **Variabilité de l'échantillonnage** : insectes adultes mobiles selon les conditions de chaleur & humidité

Analyse des corrélations symptômes – saison et symptômes – espèce



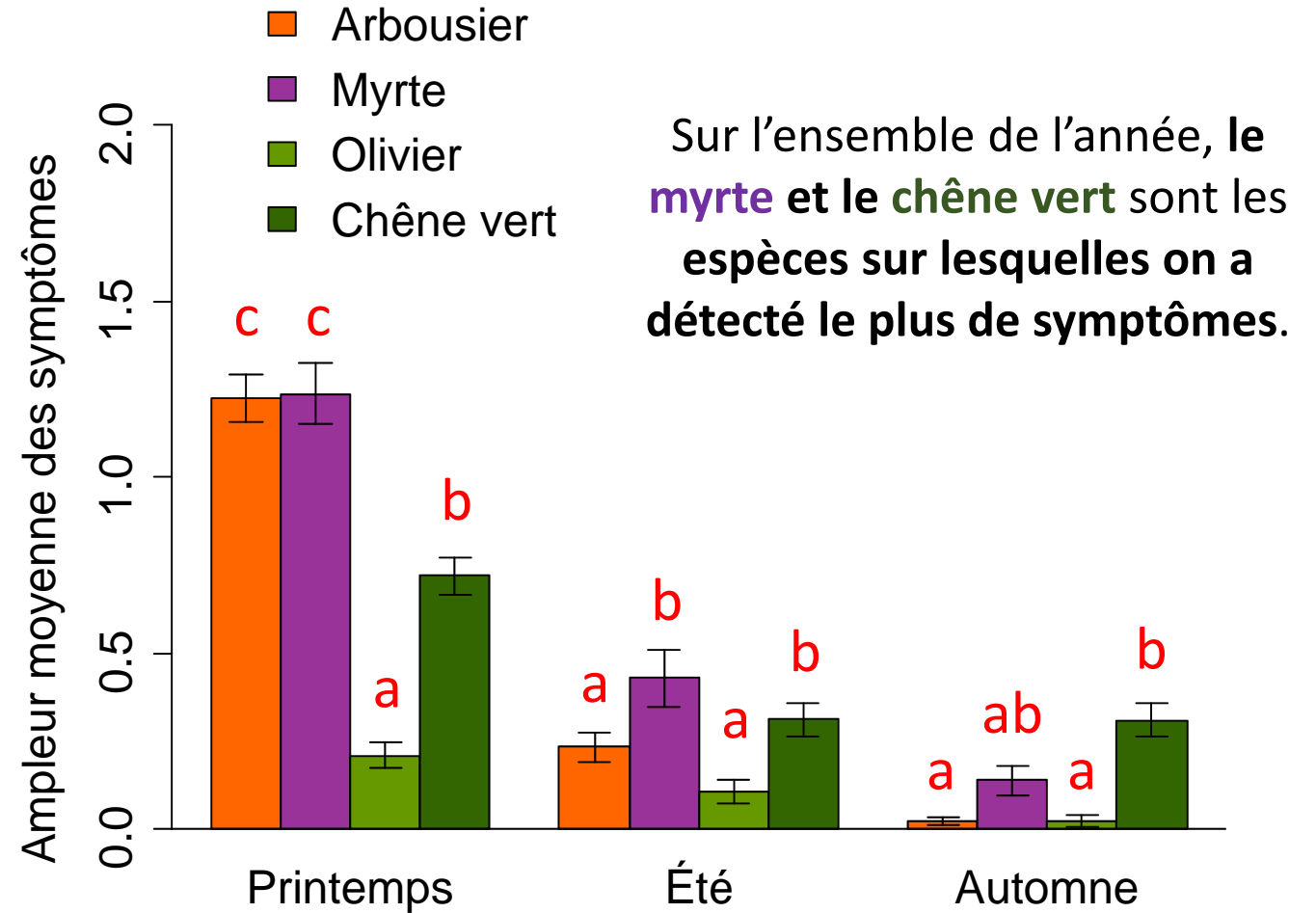
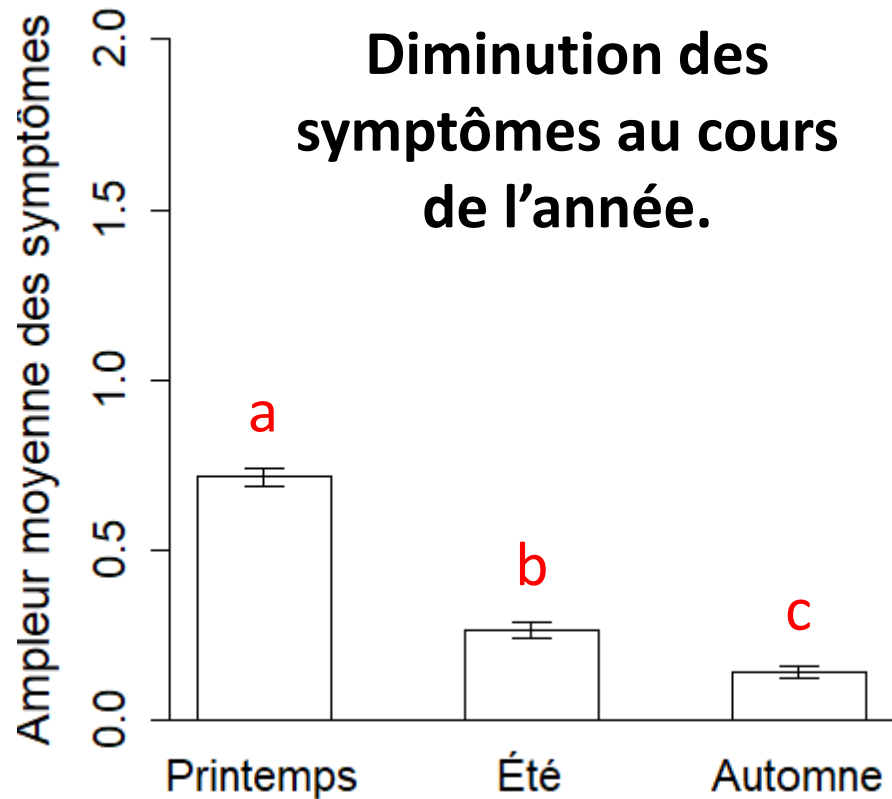
Hypothèse

Conditions très sèches en début d'année 2018 puis **de plus en plus humides.**



Diminution des symptômes au cours de l'année.

Analyse des corrélations symptômes – saison et symptômes – espèce



Conclusion

Les données 2018 ne nous permettent pas d'expliquer l'expression de symptômes dans la végétation.

Hypothèses :

- La prévalence de la bactérie dans les populations de *P. spumarius* prélevés à proximité de chaque placette pourrait expliquer plus clairement la présence de symptômes = **mesure de l'abondance de porteurs de Xf**
→ résultats à venir
- **Décalage temporel** (durée inconnue) entre la contamination d'une plante saine via un vecteur et l'apparition de symptômes sur cette plante.
→ continuer à acquérir des données / pluriannuel

Conclusions et perspectives

Affiner le réseaux de placettes en Corse

Elargir l'étude au reste de la France (voire à l'Europe). Au moins en ce qui concerne l'approche insectes sentinelles pour savoir où se trouve réellement Xf et quelles sous-espèces / souches sont présentes

→ afin de mieux diriger les efforts de surveillance, d'éliminer la pression économique sur certaines régions, d'anticiper des épidémies futures qui pourraient être dramatiques en particulier dans un contexte de changement climatiques

Échantillonnage sur la base des prévisions du risques ..

Personnes impliquées dans les projets



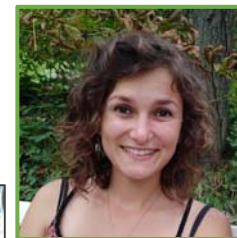
Jérôme Albre



Xavier Mesmin



Jean-Pierre Rossi



Anne-Alicia Gonzalez



Laure Sauné



Marc Gibernau



Jean-Marc Thuillier



Astrid Cruaud



Sabine Nidelet



Sylvain Santoni



Gwenaëlle Genson



Laetitia Hugot



Jean-Yves Rasplus



Eric Pierre



Martin Godefroid



Ileana Quiquerez



François Casabianca



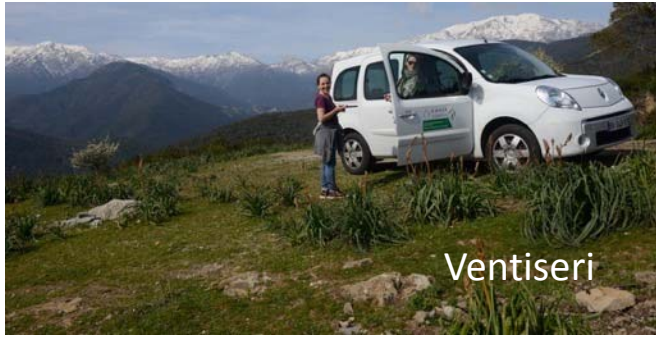
Jean-Claude Streito



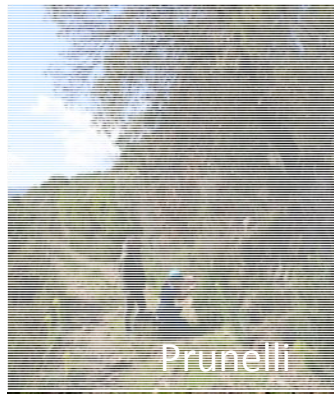
Marguerite Chartois



Maxime Bellifa



Ventiseri



Prunelli



Ventiseri



Calvi

Merci de votre attention !



Prunelli



Calenzana



Calvi



Lugo



Urtaca



Novella



Ventiseri



Ventiseri



Galeria



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT