

**AFPP – 4^e CONFÉRENCE SUR L'ENTRETIEN
DES JARDINS, ESPACES VÉGÉTALISÉS ET INFRASTRUCTURES
TOULOUSE – 19 et 20 OCTOBRE 2016**

**RECONSTRUCTION DES RÉSEAUX D'INTERACTIONS ENTRE LES PLANTES, *XYLELLA FASTIDIOSA*
WELLS et al., ET SES VECTEURS POTENTIELS À L'AIDE D'OUTILS DE SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT :
INTÉRÊT POUR LE CONTRÔLE DE LA MALADIE**

J.-Y. RASPLUS^{1*}, J.-C. STREITO¹, J.-P. ROSSI¹, G. GENSON¹, J.-F. GERMAIN², M. GODEFROID¹,
A.-A. GONZALEZ¹⁻³, S. NIDELET¹, É. PIERRE¹, S. PUISSANT⁴, S. SANTONI³ ET A. CRUAUD¹

⁽¹⁾ INRA, UMR1062 CBGP, F-34988 Montferrier-sur-Lez, France. [*rasplus@supagro.inra.fr](mailto:rasplus@supagro.inra.fr)

⁽²⁾ ANSES-LSV, F-34988 Montferrier-sur-Lez, France.

⁽³⁾ INRA, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

⁽⁴⁾ Muséum - Jardin des Sciences, F-21033 Dijon, France.

RÉSUMÉ

La détection récente de deux sous-espèces de *Xylella fastidiosa* (*Xf*) en Europe (*ssp. pauca* et *multiplex*) met l'agriculture européenne face à un défi de grande ampleur : trouver des méthodes de lutte efficaces pour gérer une maladie économiquement redoutable. En effet, un contrôle de la maladie ciblé sur une plante cultivée en particulier serait voué à l'échec du fait du large spectre de plantes-hôtes. De même, le contrôle d'un seul vecteur – même important – pourrait s'avérer inadéquat pour limiter la diffusion de la maladie. Enfin, les variations entre communautés « plantes – vecteurs » dues à des contextes géographiques et écologiques différents pourraient influencer la dynamique de transmission et potentiellement l'évolution de la virulence de la maladie. Pour ces raisons, une gestion efficace de *Xf* nécessite de mieux comprendre le contexte écologique gouvernant sa transmission. Il est donc nécessaire et urgent d'améliorer nos connaissances sur les plantes réservoirs et les vecteurs potentiels ainsi que sur la nature des interactions existants au sein de ces communautés. Le développement récent de nouvelles technologies de séquençage permet d'envisager de mieux décrire – à la fois qualitativement et quantitativement – les interactions complexes existant entre *Xf*, ses vecteurs et ses plantes-hôtes à l'interface entre milieux agricoles et habitats semi-naturels. Ces nouveaux outils permettent d'identifier les insectes porteurs de la maladie ainsi que les souches bactériennes impliquées, de décrire leur microbiome (qui peut influencer leurs traits d'histoire de vie), et de déterminer les plantes dont ils ont récemment absorbé les sèves. Nous présenterons les méthodes moléculaires haut-débit que nous développons pour décrire les interactions au sein des communautés « plantes – *Xf* – vecteurs ». Nous donnerons également un aperçu des premiers résultats obtenus et discuterons l'intérêt de ces méthodes pour mieux identifier les espèces (vecteurs ou plantes) ayant un rôle déterminant dans la propagation de la maladie au sein des agroécosystèmes.

Mots-clés : *Xylella fastidiosa*, insectes vecteurs, plantes-hôtes, interactions, NGS.

ABSTRACT

DECIPHERING THE NETWORK OF INTERACTION BETWEEN *XYLELLA FASTIDIOSA*, ITS HOST PLANTS AND POTENTIAL INSECT VECTORS USING NEXT GENERATION SEQUENCING METHODS: INTEREST FOR THE MANAGEMENT OF THE DISEASE

With the recent detection of two subspecies of *Xylella fastidiosa* (*Xf*) (*ssp. pauca* and *multiplex*), European agriculture faces a major challenge: find efficient methods to manage this serious disease. As *Xf* can contaminate multiple host plants, targeting a single plant species will be inefficient. Similarly, targeting a single species of insect vector would limit the efficiency of disease control measures. Finally, differences among plant/insect communities occurring in different ecological and geographical contexts may influence the spread and potentially also the virulence of the disease. Therefore, deciphering the network of interaction between *Xf*, its host plants, and potential insect vectors is crucial to set up efficient control measures. With next generation sequencing methods, it is now possible to simultaneously identify insects, their microbiome (that can influence their life history traits), the plants they fed on and the subspecies / strains of *Xf* they may carry. We will present the methods we are developing to describe plant-*Xf*-insect communities, give an overview of our first results and will discuss the interest of such methods to better identify plants or insects that may play a key role in the spread of the disease.

Keywords: *Xylella fastidiosa*, insect vectors, host plants, interaction, NGS.

INTRODUCTION

Xylella fastidiosa (*Xf*, Xanthomonadaceae) est une bactérie du xylème, disséminée par des insectes vecteurs, connue comme l'agent de la maladie de Pierce qui touche les vignobles californiens depuis plusieurs décennies. Elle est également responsable d'une épidémie sur *Citrus* au Brésil (Chlorose panachée des *Citrus*) depuis la fin des années 1980 (Almeida et Nunney, 2015). Un plan de surveillance national de *Xylella fastidiosa* a été publié et diffusé le 13 mai 2015 (DGAL/SDQPV/2015-449 du 13/05/2015). Parmi les 6 sous-espèces de *Xf* connues, deux ont été récemment introduites en Europe. Elles possèdent des spectres d'hôtes larges mais différents.

- *Xf* subsp. *multiplex* qui, à l'échelle mondiale, est présente entre autre sur *Prunus* spp., *Quercus* spp., *Acer* spp., *Ulmus* spp., *Platanus* spp., *Celtis australis* etc. avec des souches différenciées s'attaquant préférentiellement à certains hôtes (Nunney et al., 2013). La sous-espèce *multiplex* a été détectée en Corse en juillet 2015 sur des plants de polygales à feuille de myrte (*Polygala myrtifolia*). Deux souches (ST6, proche de la souche américaine *Dixon* isolée sur amandier (*Prunus dulcis*) et ST7, proche des souches américaines *Griffin-1* isolée sur *Quercus rubra* et M12 isolée sur amandier) ont été mises en évidence. Depuis, de nombreux foyers et de nombreuses plantes hôtes ont été identifiés dans cette région (voir <http://www.corse-du-sud.gouv.fr/xylella-fastidiosa-une-menace-qui-demande-une-a1409.html> pour un suivi en temps réel). *X. f.* subsp. *multiplex* a aussi été détectée en région PACA et pourrait s'étendre vers l'ouest du bassin méditerranéen.
- *Xf* subsp. *pauca*, présente sur *Citrus* spp., *Coffea* spp. et *Olea europea*, avec pour chacun de ces hôtes des souches différenciées (Nunney et al., 2012). Cette sous-espèce a été détectée fin 2013 dans la région des Pouilles en Italie du Sud sur oliviers et cause actuellement des dégâts majeurs sur cette culture (Saponari et al., 2013 ; Loconsole et al., 2014). La superficie de la zone contaminée couvre aujourd'hui plus de 200 000 ha. La souche de *Xf* isolée en Italie a été nommée CoDIRO [abréviation du nom italien du syndrome de déclin rapide de l'olivier (Giampetruzzi et al., 2015)]. En Italie, la bactérie est également présente, et pathogène, sur amandier (*Prunus dulcis*) et cerisier (*Prunus* sous-genre *Cerasus* sp.) ainsi que sur plusieurs espèces ornementales. A l'heure actuelle, cette souche n'est pas connue du territoire français.

On notera également qu'une souche de *Xf* a été détectée en Allemagne en avril 2016 sur un plant de *Nerium oleander* mis à l'hivernation par des particuliers dans une nurserie produisant des plantes ornementales et des légumes. Cette souche a été identifiée comme appartenant à *Xf* subsp. *fastidiosa* en juillet 2016 (après la rédaction du présent texte). Des tests sur les plantes de la nurserie et celles des propriétaires du plant contaminé sont actuellement en cours (source : http://pflanzengesundheit.jki.bund.de/dokumente/upload/3a817_xylella-fastidiosa_pest-report.pdf).

Xylella fastidiosa est une bactérie qui se transmet de plante à plante essentiellement par l'action d'un insecte vecteur dont les pièces buccales sont de type piqueur-suceur (Retchless et al., 2014 ; EFSA, 2015). Quelques cas de transmissions par outils de taille contaminés ou anastomoses racinaires ont été signalés. Seuls quelques groupes apparentés d'hémiptères, appartenant tous au sous-ordre des Auchenorrhynques, sont connus comme vecteurs de la maladie. Il s'agit essentiellement de cicadelles, de cercopes, d'aphrophorides et de cigales. La transmission de la bactérie se fait suivant trois étapes : 1) la bactérie est acquise par le vecteur qui aspire la sève d'une plante infectée ; 2) la bactérie adhère à la cuticule de la cavité buccale de l'insecte et se multiplie ; 3) la bactérie se détache et est inoculée à une nouvelle plante lors d'une nouvelle prise alimentaire de l'insecte (Redak et al., 2004).

Il est important de souligner qu'un insecte peut porter la bactérie mais être dans l'incapacité de la transmettre. L'efficacité de vexion sur de possibles plantes hôtes doit être testée afin d'évaluer de

manière fiable les risques réels représentés par les populations d'insectes présents dans les écosystèmes.

Les connaissances sur les vecteurs efficaces de la maladie sont essentiellement limitées aux espèces américaines. La quasi-totalité des vecteurs de la maladie connus sur le continent américain ne se rencontre pas en Europe et, en conséquence, les connaissances sur les vecteurs en Europe sont extrêmement fragmentaires. La liste des vecteurs susceptibles de transmettre la maladie en Europe compte 119 espèces et inclut 74 espèces de cigales dont beaucoup ont des aires de distribution restreintes. Cinquante-deux de ces espèces sont présentes en France (Chauvel et al., 2015). Chez les vecteurs américains et très probablement chez tous les vecteurs potentiels européens, l'absence de transmission trans-ovarienne (de l'œuf à la larve) et trans-stadiale (entre les stades de développement du vecteur) de *Xf* est avérée. Ceci implique que les vecteurs doivent acquérir la bactérie après chaque mue ; cette ré-acquisition est un événement rare (quand la maladie est rare dans les agroécosystèmes) mais déterminant pour la dissémination de la maladie. En Europe, l'absence supposée de vecteurs dont les stades adultes passent l'hiver est également importante dans la dynamique de la maladie. En effet, l'absence d'hivernation fait que *Xf* ne peut être transmise de plante à plante dès le début du printemps. Cependant ce postulat mérite d'être vérifié, étant donné notre méconnaissance sur l'hivernation au stade adulte de certains vecteurs potentiels présents en Corse [e.g. *Philaenus spumarius* (*Aphrophoridae*)] et le contexte actuel de réchauffement climatique. Il est également important de souligner que les communautés de vecteurs potentiels rencontrées dans les écosystèmes varient au cours du temps (e.g. variations saisonnière, circadienne) ce qui peut influencer la dynamique de dispersion de la maladie. Il est donc essentiel de pouvoir décrire et suivre, rapidement et à moindres coûts, les communautés de vecteurs présentes dans les territoires ciblés.

La détection récente des deux sous-espèces de *Xf* en Europe met l'agriculture européenne face à un défi de grande ampleur : trouver des méthodes de lutte efficace, dans un contexte de réduction des intrants, pour gérer une maladie économiquement redoutable tout en gardant à l'esprit que des recombinaisons entre sous-espèces sont possibles et pourraient impacter la dynamique de l'épidémie. Ainsi, la recombinaison entre *Xf fastidiosa* et *Xf multiplex* a été à l'origine de l'émergence d'une nouvelle sous-espèce aux USA (*Xf morus*) possédant un spectre d'hôtes différent de celui des sous-espèces recombinantes (Nunney et al., 2014).

Il est primordial de développer des stratégies locales de gestion éclairée de la maladie dans les régions infestées. Les méthodes de gestion doivent être adaptées au contexte économique, écologique (diversité biologique), social (mode de culture) et patrimonial (variétés cultivées) du territoire concerné. La contamination de multiples plantes par *Xf* rendra inopérant un contrôle de la maladie qui ciblerait une plante cultivée en particulier. De même, le contrôle ciblé sur un unique vecteur – même important dans la transmission – pourrait s'avérer inadéquat pour limiter la diffusion de la maladie. Enfin, les différences entre communautés « plantes – vecteurs » dans des contextes géographiques et écologiques différents pourraient influencer la dynamique de transmission et potentiellement l'évolution de la virulence de la maladie. Dès lors, vouloir gérer efficacement *Xf*, nécessite de mieux comprendre les interactions écologiques gouvernant sa transmission.

Cet état des lieux met en lumière la nécessité d'acquérir une connaissance solide des plantes réservoirs et des vecteurs potentiels ainsi qu'une bonne compréhension des interactions existant au sein de ces communautés. Le développement récent des techniques de séquençage permet d'envisager la description - à la fois qualitative et quantitative - des interactions complexes existant entre *Xf*, ses vecteurs et ses plantes-hôtes à l'interface milieux agricoles et habitats semi-naturels. A l'aide de ces nouveaux outils, il devient possible d'identifier simultanément les insectes et la souche bactérienne qu'ils peuvent porter et de caractériser leur microbiome (ensemble des bactéries symbiotes ou non pouvant influencer leurs traits de vie) ainsi que les plantes dont ils ont récemment absorbé les sèves.

MATERIEL ET METHODES

RECHERCHE DE FINANCEMENTS, MISE EN PLACE DE RESEAUX ET COLLECTE D'ÉCHANTILLONS

Les recherches sur les vecteurs de *Xf* viennent de débuter (les premiers financements DGAL – INRA ont débuté en janvier 2016). Un des points clés travaillé actuellement est la mise en place de réseaux de collecte nécessaires à l'obtention de matériel d'intérêt et au déroulement des expériences. Pour ce faire, des projets sont en cours de montage. Ces réseaux doivent permettre le prélèvement d'un maximum d'échantillons sur des parcelles agricoles situées dans différents contextes géographiques / écologiques, etc. Parallèlement à ces réseaux, des collectes par fauchage et battage (Chauvel et al., 2015) de plantes hôtes potentielles des vecteurs ont été réalisées depuis l'été 2015. Les spécimens collectés sont stockés en alcool 75° puis identifiés à l'espèce par l'étude de leurs caractères morphologiques. Cette étape d'identification via la morphologie est essentielle pour la constitution de la base de données de référence (voir ci-dessous).

CONSTRUCTION DES BASES DE DONNÉES DE RÉFÉRENCE POUR L'IDENTIFICATION DES VECTEURS ET DES PLANTES

Avant la réalisation d'études visant à la caractérisation des réseaux d'interactions, il est nécessaire de disposer de bases de données de référence pour l'identification des insectes vecteurs potentiels de *Xf* et de leurs plantes hôtes. Ces bases de données stockent, pour chaque espèce, la séquence d'un petit fragment de son ADN. Ce fragment est appelé barcode ou code-barre. Par comparaison avec cette banque de barcodes, il devient possible d'identifier à l'espèce n'importe quel insecte, quelque soit son stade de développement, ou n'importe quelle plante (les œufs et les larves sont difficilement identifiables par des caractères morphologiques, de même que les sèves ingérées !). L'identification devient donc extrêmement rapide et à la portée de tout organisme de surveillance ne disposant pas d'expertise taxonomique particulière. Pour construire cette base de données, nous avons choisi de séquencer le gène *COI* (code-barre classique des insectes) sur au moins une dizaine d'individus par espèce, si possible issus de différentes localités, afin d'avoir une bonne image de la variabilité génétique à l'intérieur de l'espèce. Le séquençage du *COI* sera complété par celui d'un marqueur nucléaire dans le cas où celui-ci ne suffirait pas (introgression mitochondriale, existence de complexes d'espèces, difficultés d'identification par *COI* rencontrées chez les cigales). Les bases de données de référence seront construites grâce aux méthodes de séquençage haut-débit afin de réduire les coûts.

Pour les plantes, deux marqueurs seront séquencés : un marqueur chloroplastique (*rbcl* ou *matK*, qui sont les fragments standards utilisés dans le barcoding des plantes) et un marqueur nucléaire (*ITS2*). En effet, il est important de compléter l'information contenue dans les marqueurs chloroplastiques par une information nucléaire car les chloroplastes peuvent être échangés entre des espèces de plantes proches taxonomiquement. De plus, étant donné qu'après ingestion l'ADN de la plante est rapidement dégradé, cibler plusieurs marqueurs permettra d'augmenter les chances de séquencer au moins l'un d'entre eux. Comme pour les insectes, plusieurs individus par espèce (5) seront séquencés pour mieux refléter la variabilité génétique intraspécifique dans la base de référence et permettre ainsi une identification plus fiable des plantes dont les sèves sont consommées par les vecteurs. Les séquences disponibles dans les bases de données de référence mondiales (e.g. NCBI) seront également intégrées à la base pour augmenter sa représentativité et accroître les possibilités d'identification des sources d'alimentation des vecteurs potentiels.

En plus des barcodes, des informations sur la taxonomie, la biologie et la distribution des insectes / plantes ainsi que des illustrations, seront également mises à disposition. La structure de base de données utilisée sera celle développée dans le cadre du projet FP7 Qbol, barcoding des Arthropodes de quarantaine pour l'Europe, incluant déjà les vecteurs américains de *Xf* (<http://www.q-bank.eu/Arthropods/>).

RECONSTRUCTION DES RESEAUX D'INTERACTIONS

L'équation de départ est la suivante :

Nombre (Nb) d'échantillons séquençables = Nb de séquences * Nb de gènes ciblés * Profondeur de séquençage.

Avec Nb de séquences contraint par les séquenceurs actuellement disponibles sur le marché et profondeur de séquençage = nombre de fois qu'un nucléotide est effectivement séquencé (on place un minimum à 30 fois pour éviter les erreurs de lecture).

Avec les nouvelles techniques de séquençage, il est maintenant possible d'obtenir environ 15 à 20 millions de séquences à partir d'un échantillon (contre une seule avec la technologie Sanger classique) et des fragments d'environ 500 pb. Il est donc envisageable de séquencer plusieurs centaines d'individus sur plusieurs marqueurs grâce à ces techniques. Afin de reconstruire les réseaux d'interaction, les marqueurs ciblés seront *COI* + autre si besoin (insectes), *rbcL* ou *matK* + *ITS2* (plantes), les marqueurs diagnostiques de *Xf* (les 7 voire 9 marqueurs utilisés dans les analyses de typages multilocus <http://pubmlst.org>). Afin d'étudier le microbiome des vecteurs, nous séquencerons dans le même temps le gène *16S* (régions V3 et V4) pour lequel existent des bases de données de référence permettant l'identification des espèces de bactéries (Silva).

Les séquences obtenues seront analysées par un pipeline bioinformatique en place dans notre laboratoire. Ce pipeline regroupe les logiciels les plus pertinents et fiables pour réaliser chacune des étapes de l'analyse ainsi que quelques scripts perl / bash spécifiquement écrits pour obtenir des informations supplémentaires (notamment pour le contrôle qualité des données).

Une fois les données obtenues, des analyses seront conduites pour tester la possible corrélation entre différentes variables (e.g. espèces de vecteurs, plantes d'alimentation, géographie, présence ou absence de *Xf* etc.) et la composition des microbiomes. Les méthodes classiques d'analyse de réseaux seront utilisées (e.g. Brandes et Erlebach (2005)).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RECHERCHE DE FINANCEMENTS, MISE EN PLACE DE RÉSEAUX, COLLECTE D'ÉCHANTILLONS

Le financement par la DGAL et l'INRA d'un projet de recherche sur *Xylella* a permis de lancer les recherches nécessaires, et des collaborations ANSES-INRA ont été mises en place pour développer des échanges optimaux entre la recherche et les organismes de surveillance. Le projet européen dans lequel l'INRA est impliqué (H2020 SFS-09-2016 XFACTORS) a été retenu en juin 2016 pour financement par l'Union européenne (2017-2019) dans le cadre de l'appel d'offre spécial *Xylella* ouvert en octobre 2015. Plusieurs autres projets sont en cours de rédaction (e.g. dans le cadre du RFSV – Réseau Français pour la Santé Végétale : <http://www.rfsv.fr>, avec le CBNC : conservatoire botanique national de Corse : <http://cbnc.oec.fr>). La recherche menée est donc inscrite dans un contexte global cohérent. A l'échelle nationale, un réseau de collecte est déjà opérationnel au sein du réseau Afidol (Association française interprofessionnelle de l'Olive). Les membres volontaires du réseau ont été formés à la collecte des échantillons d'insectes par fauchage sur des parcelles préalablement définies lors de réunions et sorties de terrain conjointes INRA-Afidol. Parallèlement, des récoltes de cigales via des pièges d'interception seront réalisées par le Département de la Santé des Forêts (DSF) sur une partie du pourtour méditerranéen français et par des prospections ciblées sur ce groupe. Plusieurs missions en Corse et dans les régions du pourtour méditerranéen français ont été réalisées afin de collecter les espèces d'insectes vecteurs potentiels, porteurs ou non de la bactérie. Une fois collectés, les spécimens ont été identifiés à l'espèce par l'étude de caractères morphologiques notamment génitaux. Une fois l'ensemble des espèces de vecteurs rentré en base de données, il deviendra possible d'identifier rapidement à l'espèce tout spécimen, quelque soit son stade de développement par comparaison d'un fragment de son ADN avec la base de données de référence. La collecte des plantes n'a pas encore débuté, elle est tributaire des financements que nous pourrions acquérir.

MISE EN PLACE DES BASES DE DONNÉES DE RÉFÉRENCE

La base de données de référence pour l'identification des insectes est en cours de construction, celle des plantes sera mise en place dès que les financements le permettront. Le protocole testé et retenu est présenté en Figure 1. Il repose sur une approche innovante et simple, pouvant être réalisée dans n'importe quel laboratoire sans investissement lourd : 2 étapes successives de PCR. La première permet l'amplification du barcode et la seconde permet d'attacher au fragment amplifié des petits index qui permettent de retrouver à quel individu appartient la séquence parmi les 15 millions de séquences obtenues. Nous ne détaillerons pas le pipeline bio-informatique complexe qui a été construit, nous travaillons à son optimisation pour le rendre plus accessible. Les séquences obtenues par ces méthodes innovantes ont été comparées avec des séquences Sanger produites en routine depuis de nombreuses années dans notre laboratoire, ce qui nous a permis de valider notre approche.

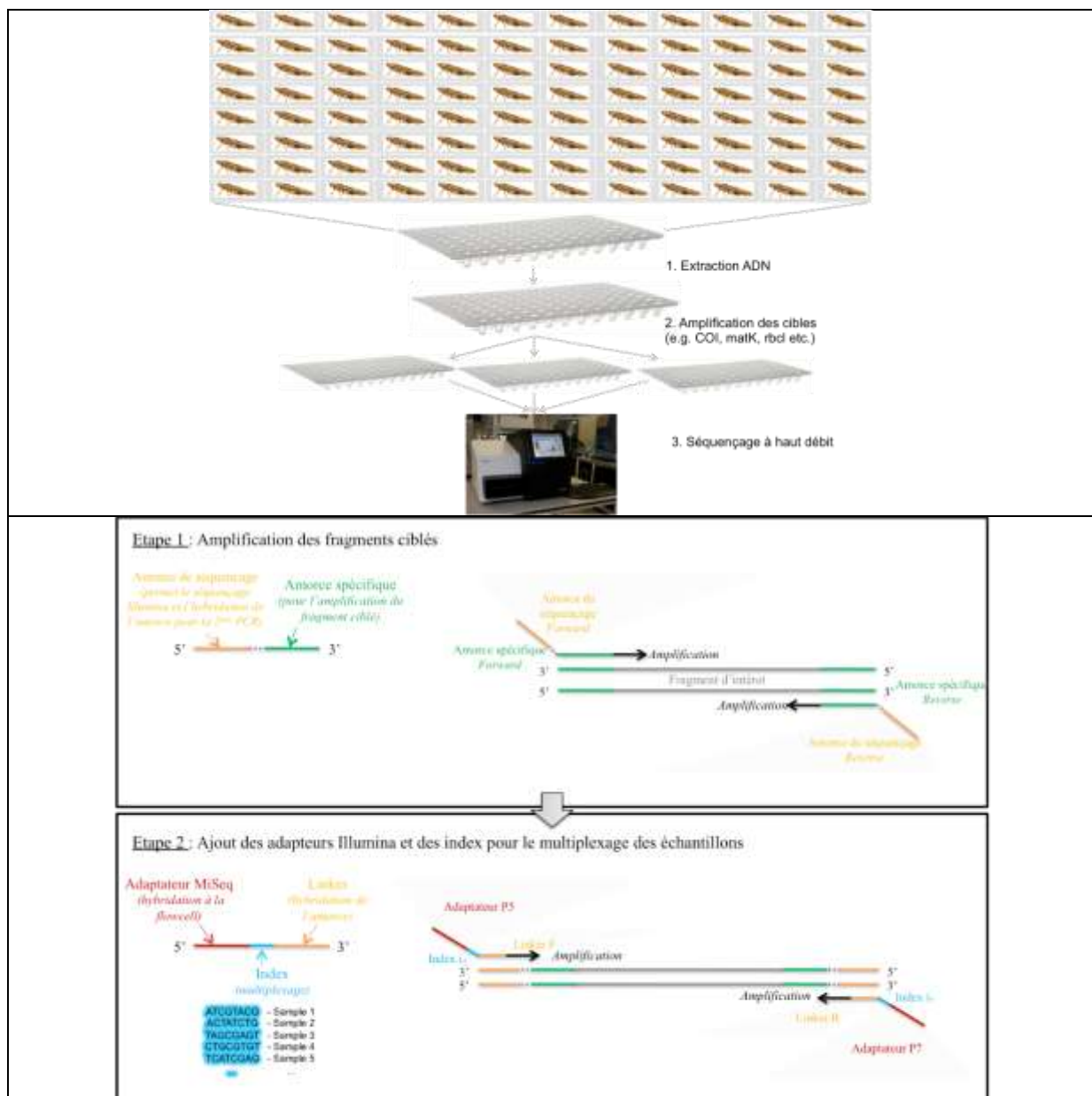


Figure 1 : Workflow for the processing of insect samples stored in the reference database. Traitement des échantillons d'insectes pour la construction des bases de données de référence. Le processus sera le même pour les insectes et les plantes, seuls changeront la méthode d'extraction d'ADN et les gènes ciblés. Le schéma du haut montre les 3 principales étapes du processus de traitement des échantillons. Ceux-ci sont conditionnés par plaque de 96 individus, l'utilisation de la robotique est ainsi possible, permettant de traiter un grand

nombre d'échantillons. L'extraction d'ADN est suivie de l'amplification et du séquençage des marqueurs qui constitueront les catalogues de référence. Le schéma du bas détaille le protocole d'amplification des marqueurs. Deux étapes successives de PCR sont réalisées. La première permet d'amplifier le marqueur ciblé, la seconde permet d'attacher à chaque marqueur une combinaison d'index spécifique de chacun des 96 individus de la plaque. Les produits de PCR peuvent ainsi être mélangés et séquencés simultanément sur les séquenceurs de nouvelles générations (MiSeq) qui produisent environ 15 à 20 millions de séquences (modifié de Cruaud et al., soumis).

Actuellement près de 400 barcodes sont disponibles dans la base de données en cours de construction (10 espèces européennes et 5 espèces nord-américaines susceptibles d'être introduites). Jusqu'alors les insectes n'avaient été collectés qu'en fin d'été 2015. Les spécimens récoltés en 2016 dans le cadre des projets qui ont débuté viendront compléter la base de données qui sera ouverte au public dès mi 2017. Chaque espèce y est référencée par une fiche fournissant les informations et illustrations essentielles à sa caractérisation (taxonomie, morphologie, biologie, distribution, etc., Figure 2). Un outil intégré à la base permet l'identification à l'espèce d'une séquence déposée par un utilisateur (BLAST ou inférence d'arbres).

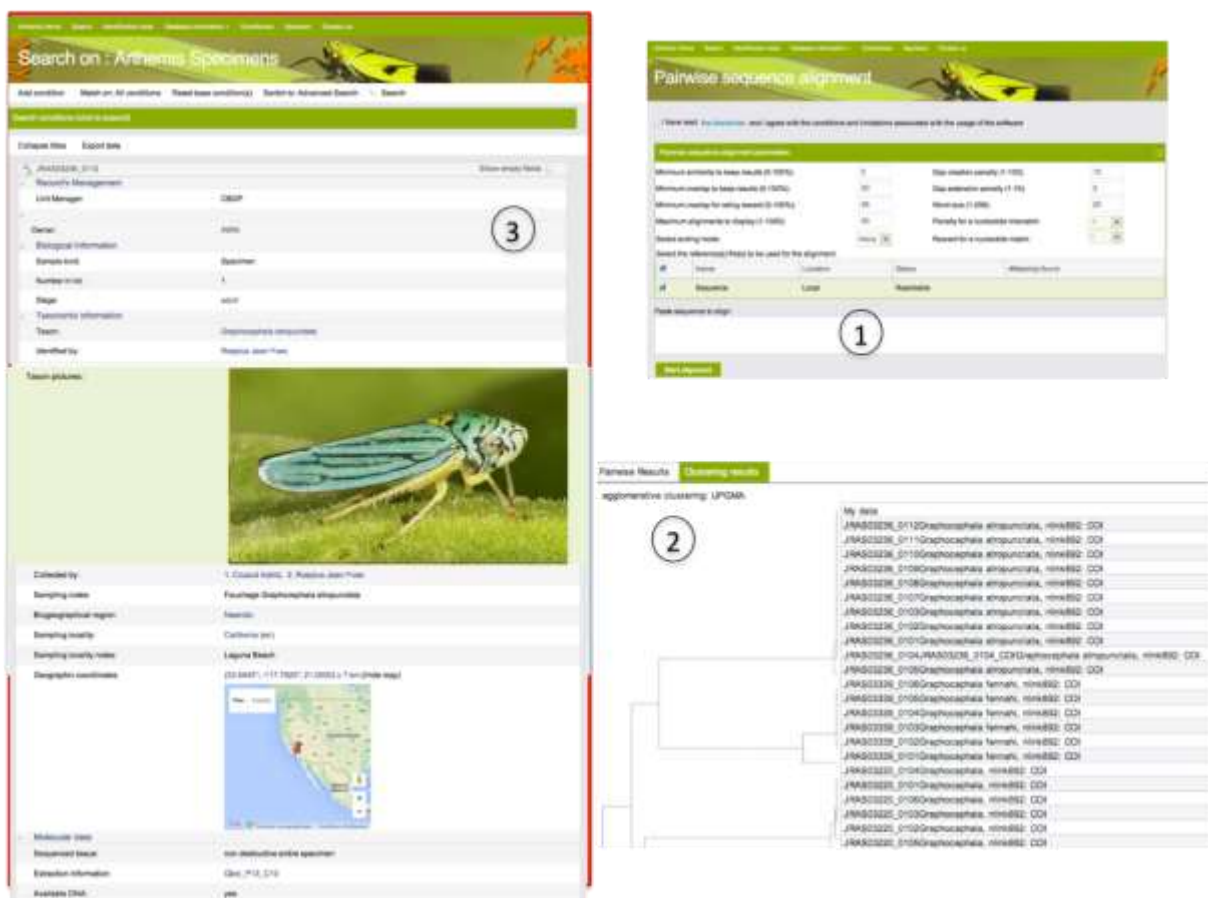


Figure 2. Screenshots depicting some features of the web-interface database that will be available at the end of the project. Copies d'écran illustrant quelques fonctionnalités des bases de données interfacées sur le web qui seront mise en ligne à la fin du projet (e.g. <http://arthemisdb.supagro.inra.fr>).

1. L'utilisateur dépose la séquence qu'il veut comparer avec le catalogue moléculaire de référence mis en place lors des projets.
2. Un arbre est produit montrant la position relative de sa séquence par rapport à celles contenues dans le catalogue. Dans l'exemple, la séquence est identique à celle de spécimens de *Graphocephala atropunctata* (vecteur américain de *Xf*).
3. L'utilisateur qui clique sur le nom « *Graphocephala atropunctata* » est redirigé vers une fiche contenant des informations sur l'espèce.

Ces bibliothèques de barcodes permettent une identification moléculaire fiable et rapide. Elles sont indispensables pour mieux comprendre l'éventuelle diffusion de la maladie via les différentes espèces de vecteurs et pour assurer une biosurveillance efficace (elles rendront par exemple possible l'identification automatisée de contenus de pièges : tous les insectes sont séquencés ensemble afin d'être identifiés par séquençage sans recours à une identification morphologique individu par individu).

A moyen terme, les espèces qui - par ailleurs - seraient identifiées comme d'importants vecteurs pourraient également faire l'objet d'analyses génétiques afin d'estimer un certain nombre de paramètres (taille des populations, migration, etc.).

PREMIERS RÉSULTATS OBTENUS POUR LES RÉSEAUX D'INTERACTIONS

A ce jour, nous avons mis au point une méthode permettant la caractérisation simultanée d'un vecteur et de son microbiome par séquençage du COI et du 16S en suivant le protocole de la Figure 1. Cette méthode a permis d'identifier des différences de composition du microbiome entre espèces de vecteurs. En passant à un volume d'échantillons encore plus important, nous pourrions étudier d'éventuelles différences de composition de microbiomes entre populations porteuses et non porteuses de *Xf* afin de mieux comprendre les dynamiques de la maladie.

Des tests sont en cours afin d'identifier les sèves ingérées ainsi que pour caractériser finement les souches de *Xf* éventuellement présentes. On notera ici que la méthode en deux étapes de PCR pourrait être remplacée par une méthode de capture d'ADN cible moins versatile (certaines polymérases, enzymes permettant la PCR, étant inhibées par les molécules contenues dans les yeux d'insectes ou les tannins des plantes).

La biologie des espèces potentielles de vecteurs est mal connue. En particulier, les plantes consommées par les vecteurs. Ces plantes d'alimentation ne sont pas uniquement les plantes sur lesquelles les larves des vecteurs se développent. Les préférences alimentaires des vecteurs potentiels demeurent également incertaines. On ignore si c'est la fréquence de l'espèce de plante dans le milieu qui en fait un hôte préférentiel où s'il existe d'autres facteurs (e.g. reconnaissance chimique de l'hôte et choix réel) structurant les réseaux d'alimentation. En effet, la littérature cite pêle-mêle, de nombreuses espèces de « plantes hôtes » sans distinguer les plantes d'alimentation des plantes de développement. Par exemple, plus de 300 espèces de « plantes hôtes » sont recensées pour *Philaenus spumarius*. Il est par ailleurs possible que les préférences alimentaires puissent varier au cours des saisons et en fonction des plantes présentes dans les différentes localités prospectées. Parallèlement, les plantes hôtes de *Xf* sont citées sans lien explicite avec les plantes d'alimentation des vecteurs. La non imbrication des listes limite leur utilité en terme de lutte contre la maladie. Il est par conséquent nécessaire de clarifier les sources d'alimentation préférentielles des vecteurs potentiels dans les agro-écosystèmes. Les méthodes que nous mettons actuellement au point devraient nous aider à comprendre comment des plantes contaminées par la bactérie, mais ne montrant aucun signe extérieur (asymptomatique) ou des plantes malades, peuvent être utilisées par des vecteurs et devenir ainsi des réservoirs de la maladie. Notre objectif est d'identifier ces réservoirs de manière à comprendre notamment le rôle des milieux semi naturels adjacents des zones de cultures dans la propagation de la maladie.

CONCLUSIONS

Des programmes de recherche ont été récemment mis en place afin de travailler sur les vecteurs potentiels de *Xf*. Nous sommes en train de construire les bases de données de référence qui permettront leur identification fiable et rapide. En parallèle, nous travaillons à l'élaboration et à l'application de protocoles innovants avec pour ambition de reconstruire les réseaux d'interactions entre *Xf*, ses vecteurs, ses plantes hôtes et les autres bactéries que les insectes peuvent porter. Mieux comprendre les dynamiques en jeu lors de la propagation de la maladie est un préalable au développement de méthodes de gestion de la maladie.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et le département Santé des Plantes et Environnement (SPE) de l'INRA pour la confiance et les financements qu'ils nous ont accordés.

BIBLIOGRAPHIE

- Almeida, R.P., Nunney, L., 2015. How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge ? Plant Disease 99, 1457-1467.
- Brandes, U., Erlebach, T., 2005. Network analysis: methodological foundations. Springer Science & Business Media.
- Chauvel, G., Cruaud, A., Legendre, B., Germain, J.-F., Rasplus, J.-Y., 2015. Rapport de mission d'expertise sur *Xylella fastidiosa* en Corse. Disponible à l'adresse suivante : http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/20150908_rapport_mission_corse_xylella_3108_2015b.pdf.
- Cruaud, P., Rasplus, J.-Y., Genson, G., Benoît, L., Cruaud, A., submitted. High throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. Scientific reports.
- EFSA, 2015. Panel on Plant Health (PLH), European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction, EFSA Journal 13(1), 3989.
- Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Saponari, M., Donvito, G., Italiano, A., Loconsole, G., Boscia, D., Cariddi, C., Martelli, G.P., Saldarelli, P., 2015. Draft genome sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO strain. Genome Announcements 3, e01538-01514.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasher, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M.R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Savino, V., Saponari, M., 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. Journal of Plant Pathology 96, 7-14.
- Nunney, L., Schuenzel, E.L., Scally, M., Bromley, R.E., Stouthamer, R., 2014. Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. Applied and Environmental Microbiology 80, 3025-3033.
- Nunney, L., Vickerman, D.B., Bromley, R.E., Russell, S.A., Hartman, J.R., Morano, L.D., Stouthamer, R., 2013. Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. Applied and Environmental Microbiology 79, 2189-2200.
- Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R.E., Stouthamer, R., 2012. Detecting Genetic Introgression: High Levels of Intersubspecific Recombination Found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. Applied and Environmental Microbiology 78, 4702-4714.
- Redak, R.A., Purcell, A.H., Lopes, J.R., Blua, M.J., Mizel, R.F., Andersen, P.C., 2004. The biology of Xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Annual Review of Entomology 49, 243-270.
- Retchless, A.C., Labroussaa, F., Shapiro, L., Stenger, D.C., Lindow, S.E., Almeida, R.P., 2014. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts. In: Heidelberg, S.B. (Ed.), Genomics of Plant-Associated Bacteria pp. 177-202.
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F., Martelli, G.P., 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Journal of Plant Pathology 95, 668.