

**AFPP – JOURNÉE D'INFORMATIONS TECHNIQUES ET SCIENTIFIQUES SUR LE NÉMATODE DU PIN
BORDEAUX– 22 OCTOBRE 2015**

**OUTILS DE DETECTION PRECOCE DU NEMATODE DU PIN UTILISABLES EN FORET
ET POUR LES BOIS QUI CIRCULENT**

G. ANTHOINE ⁽¹⁾, A.-M. CHAPPE ⁽²⁾

⁽¹⁾ ANSES ; Laboratoire de la santé des végétaux ; 7 rue Jean Dixmeras ;49044 Angers cedex ; France

⁽²⁾ ANSES ; Laboratoire de la santé des végétaux ; unité de nématologie ; BP35327 ; 35653 Le Rheu cedex ; France

RÉSUMÉ

Bursaphelenchus xylophilus, nématode du pin est l'objet de nombreuses publications visant à améliorer sa détection. Les techniques de biologie moléculaire les plus avancées (PCR temps réel, LAMP) constituent des outils sensibles et adaptés pour une détection précoce. Ils sont déjà mis en œuvre en France. La télédétection offre aussi des perspectives intéressantes pour la surveillance des peuplements et la détection précoce d'arbres dépérissant. Toutefois les modalités d'application de cette méthodologie restent à préciser. L'amélioration d'autres éléments pourraient aussi contribuer à la détection précoce du nématode, comme les modalités de prélèvement et d'échantillonnage, ainsi que les méthodes directes d'extraction des nématodes.

Mots-clés : télédétection, LAMP, PCR temps réel.

ABSTRACT

TOOLS FOR THE EARLY DETECTION OF THE PINEWOOD NEMATODE, APPROPRIATE FOR THE SURVEY OF FORESTS AND WOOD MATERIAL

Bursaphelenchus xylophilus, the pinewood nematode, is the subject for many studies aiming at improving its detection. The most advanced technics in molecular biology (e.g. real time PCR, LAMP) are sensitive and appropriate tools for early detection. They are already in use in the framework of French official survey. Remote sensing also offers interesting perspectives for the benefit of forest survey and early detection of declining trees. However the conditions of use of this method need to be specified. The improvement of other items could also contribute to early detection of the nematode, i.e. appropriate sampling strategy and methods for direct extraction of the nematode.

Keywords: remote sensing, LAMP, real time PCR.

INTRODUCTION

Le nématode du pin (*Bursaphelenchus xylophilus*) constitue une menace importante pour tous les territoires hébergeant des peuplements forestiers sensibles. La détection d'un foyer de nématode du pin au Portugal en 1999 (Mota *et al*, 1999), a sensibilisé les états membres de l'Union européenne à une surveillance accrue de leur territoire vis-à-vis de cet organisme.

Cette surveillance se traduit certes par des analyses régulières des peuplements et des bois en circulation. Toutefois la difficile lutte contre ce nématode incite au développement et à l'application de méthodes permettant une détection précoce pour gérer cette menace très en amont.

Les principaux axes de développement technologique concernent d'une part la télédétection des symptômes de dépérissement et d'autre part le développement d'outils moléculaires très sensibles pour détecter la présence du nématode.

Bien que pertinents, ces développements présentent des limites à bien prendre en compte pour assurer une surveillance optimisée.

LA TELEDETECTION AU SERVICE DE LA SURVEILLANCE

Dans les conditions climatiques adaptées, la présence de *B. xylophilus* dans des espèces de pins sensibles génère des symptômes de dépérissement. Ces dépérissements se traduisent par des décolorations et la mortalité des aiguilles (Figure 1). Ces changements de couleur du couvert végétal sont perceptibles à l'œil, mais l'observation des canopées des pins est impossible depuis le sol.



Figure1 : Evolution de la coloration des aiguilles de pins infestés par *B. xylophilus*, de l'arbre sain (à gauche) à l'arbre mort (à droite) (© Thomas Schröder, JKI).

Dans ce contexte, une surveillance régulière de l'évolution de la coloration des houppiers de pins depuis le ciel peut permettre d'identifier des zones sensibles présentant des symptômes de décoloration et potentiellement de dépérissement. L'observation la plus complète est permise par la télédétection (cf. encadré 1) en identifiant, après traitement des données acquises, des zones de végétation plus ou moins dépérissantes (Figure 2).

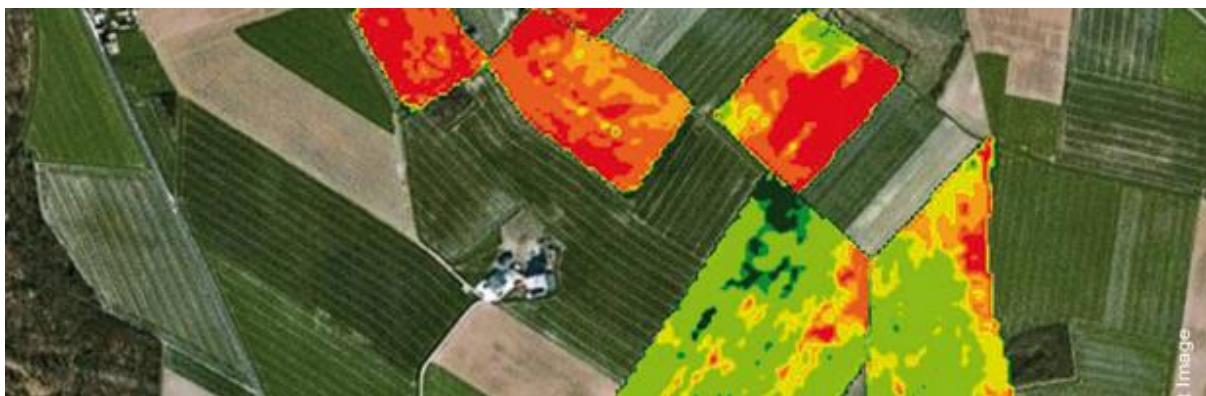


Figure 2 – Illustration de l'analyse de données issues de la télédétection pour cartographier l'état de la végétation. Les couleurs différentes représentent des états de végétation différents (© www.farmstar-conseil.fr).

Depuis plusieurs années, des équipes chinoises et japonaises étudient les modalités d'utilisation de la télédétection pour la détection indirecte du nématode du pin.

Wang *et al.* (2008), dans leur étude réalisée dans les territoires de l'est de la Chine sur *Pinus massoniana*, ont décrit deux types de profils distincts détectables et correspondant à des dispersions différentes du nématode, continue ou discontinue. Ces résultats peuvent constituer un éventuel bénéfice pour la gestion des changements écologiques consécutifs à l'expansion du nématode du pin, mais ils ne constituent pas à proprement parlé un outil de détection précoce.

Zaman *et al.* (2010) ont quant à eux étudié la détection et l'analyse des symptômes dus au nématode du pin dans la zone de Komagane City, Préfecture de Nagano. L'objectif était d'établir une relation claire entre les symptômes observés et le statut de *P. resinosa* à partir des données de télédétection.

Ju *et al.* (2014) ont déterminé qu'il était possible de détecter une infection par *B. xylophilus* 30 jours après inoculation de *P. massoniana* en corrélant l'émission spectrale et la variation du contenu en chlorophylle.

Enfin Liu *et al.* (2015) ont établi que le taux de transpiration de *P. massoniana* pouvait être un indicateur pertinent de la présence du nématode du pin. En effet le taux de transpiration des pins est fortement corrélé aux émissions infrarouges. Aussi les caractéristiques spectrales d'un arbre ou d'un peuplement pourraient être utilisées pour une détection précoce de *B. xylophilus*.

A noter qu'aussi intéressants que soient ces résultats, ils s'appliquent à des espèces de pins différentes de celles présentes dans les peuplements français ou européens. Par ailleurs, la qualité de la mesure est aussi dépendante des conditions de mesure (rayonnement solaire, disposition des peuplements...). La méthodologie doit donc être adaptée au contexte spécifique et le choix de la technologie adapté (moyens de télédétection aéroportés de type avion, drone...) (Figure 3).

Une des limites de cette approche par télédétection est le fait que le dépérissement de pins n'est pas spécifique de la présence du nématode. De nombreux facteurs peuvent induire des dépérissements : parasitisme par d'autres organismes (scolytes), sécheresse, incendie.... L'approche par télédétection devra toujours être complétée par une analyse de terrain.



Figure 3 – Différents modes de télédétection : manuel ou aéroporté

Encadré 1 – Qu'est-ce que la télédétection?

(d'après <https://fr.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9l%C3%A9d%C3%A9tection>)

La télédétection désigne, dans son acception la plus large, la mesure ou l'acquisition d'informations sur un objet ou un phénomène, par l'intermédiaire d'un instrument de mesure n'ayant pas de contact avec l'objet étudié. C'est l'utilisation à distance de n'importe quel type d'instrument (par exemple, d'un avion, d'un engin spatial, d'un satellite ou encore d'un bateau) permettant l'acquisition d'informations sur l'environnement. On fait souvent appel à des instruments tels qu'appareils photographiques, lasers, radars, sonars, sismographes ou gravimètres. La télédétection moderne intègre normalement des traitements numériques mais peut tout aussi bien utiliser des méthodes non numériques.

Ce type de méthode d'acquisition utilise normalement la mesure des rayonnements électromagnétiques émis ou réfléchis des objets étudiés dans un certain domaine de fréquences (infrarouge, visible, micro-ondes). Ceci est rendu possible par le fait que les objets étudiés (plantes, maisons, surfaces d'eau ou masses d'air) émettent ou réfléchissent du rayonnement à différentes longueurs d'onde et intensités selon leur état (Figure 4).

Alors que l'astronomie pourrait être considérée comme de la télédétection (poussée à l'extrême), le terme télédétection est généralement réservé aux observations terrestres.

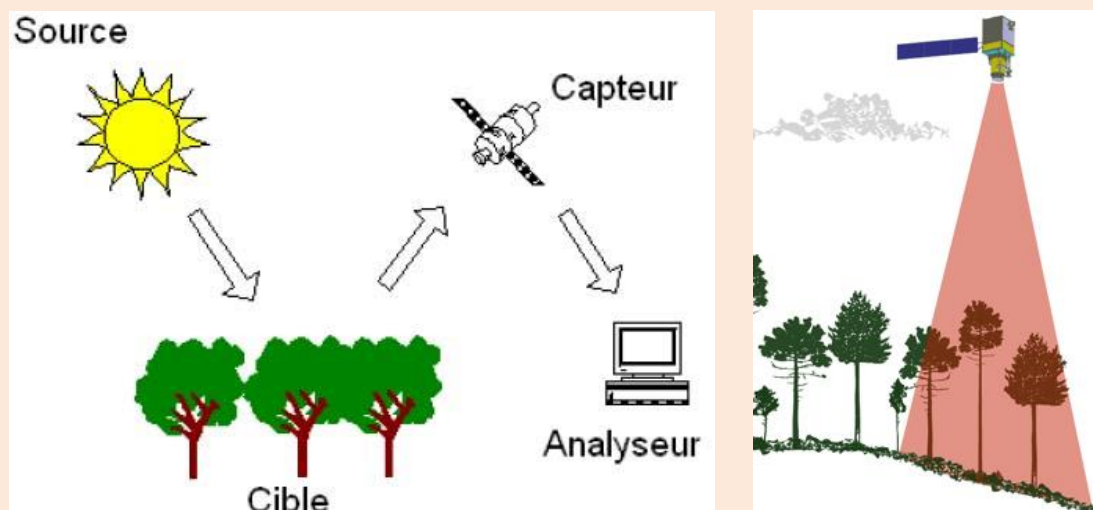


Fig. 4 - Processus de la télédétection (à gauche) et représentation de la mesure sur peuplement forestier (à droite)

Source: <http://www.fao.org/docrep/005/x2038f/x2038f09.htm> (Sept. 2015)

Pour plus d'information :

<http://www.cartographie.ird.fr/refugies/methodes-Teledec.html>

LA DETECTION PRECOCE PAR ANALYSES MOLECULAIRES

La plupart des surveillances des peuplements de pins en Europe vis-à-vis de *B. xylophilus* se fait sur la base de l'observation morphologique. Toutefois, les équipes de recherche internationales développent des tests basés sur les techniques d'amplification de génome. Aujourd'hui de nombreux tests sont disponibles, il reste à ajuster et fiabiliser leur utilisation. Une partie de ces tests relèvent de la technique dite de Polymerase Chain Reaction temps réel, qui permet une amplification d'une zone du génome tout en permettant sa détection en temps réel (sans attendre la fin de la manipulation) (Figure 5). Cette technique, qui est mise en œuvre en laboratoire, est sensible et spécifique. Son automatisation est possible pour permettre des analyses à haut débit.

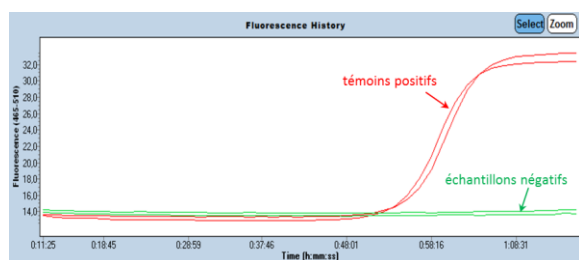


Figure 5 : Exemple de résultats obtenus lors d'une amplification par PCR temps réel

Différents tests ont été publiés pour la détection du nématode sans distinction de son statut vivant ou mort (Cao *et al.*, 2005 ; François *et al.* 2007 ; Leal *et al.*, 2007 ; 2009 ; Huang *et al.*, 2010 ; Ye *et al.*, 2013). A ce jour, la surveillance du territoire français intègre déjà ces technologies aussi bien pour l'analyse des peuplements que des vecteurs piégés (Anses 2015a et 2015b).

D'autres tests permettent la détection spécifique de nématodes vivants en ciblant certaines zones du génome exprimées uniquement si l'organisme est vivant (Leal *et al.* 2013). Ce type de test est particulièrement intéressant. Il permet une détection à faible niveau de contamination et, dans le cas de bois en circulation sur le territoire, de faire la différence entre des nématodes morts résultant d'un traitement adapté (type ceux recommandés dans la norme NIMP15) de nématodes bien vivants. Cet outil n'est pas encore mis en œuvre dans le cadre de la surveillance du territoire français et des marchandises importées. La mise en œuvre de ce type de test est plus délicate et peut engendrer plus facilement des résultats faussement négatifs.

Ces dernières années, un nouveau type d'analyse moléculaire émerge pour une analyse rapide et au plus près du terrain. Il s'agit de la technique LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) (cf encadré 2). Cette technique ne nécessitant dans l'absolu que de peu d'équipements et pour la plupart des équipements peu sophistiqués, ce type de test pourrait être adapté pour la réalisation d'analyses au plus près des zones de prélèvement ou d'import.

Des tests spécifiques pour *B. xylophilus* ont été développés (Kikuchi *et al.*, 2009 ; Kanetani *et al.*, 2011 ; Aikawa *et al.*, 2011 ; Leal *et al.*, 2015). Toutefois ces tests montrent généralement une sensibilité moindre comparés aux outils moléculaires décrits ci-dessus. L'application de la LAMP à la détection du nématode du pin pose généralement le problème de l'extraction du nématode et des acides nucléiques correspondants pour laquelle le recours à des équipements et des méthodologies uniquement disponibles en laboratoire est indispensable.

Encadré 2 – La technique LAMP

La technique d'amplification isothermale LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) permet de réaliser une amplification de l'ADN à une température constante de 65° C. Dans l'absolu et selon les cibles à tester, on peut amplifier de l'ADN sans équipement de biologie moléculaire, sans extraction et certains protocoles permettent le diagnostic au champ avec un simple bain-marie. Publiée en 2000 par Notomi, la technique connaît un essor récent en phytopathologie avec des publications régulières. La mise sur le marché de kits commerciaux dédiés et d'équipements spécifiques contribue au déploiement de cette technologie (Figure 6).

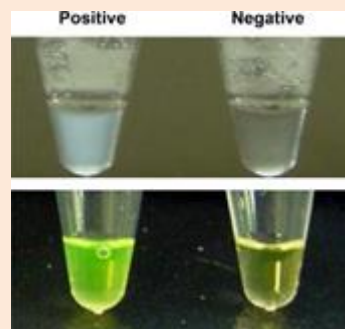


Figure 6 – Aspects des résultats d'amplification par LAMP : en haut différence de turbidité à l'œil nu entre les positifs (présence de turbidité en cas d'amplification) et les négatifs (absence de turbidité). En bas, différence de fluorescence (lecture avec un équipement spécifique) entre les positifs (présence de fluorescence en cas d'amplification) et les négatifs (absence de fluorescence).

(©<http://www.markergene.com/newsletters/newsletter0311/> Sept 2015)

La détection précoce par outil moléculaire est donc largement appliquée en France dans le cadre de la surveillance des peuplements et des bois en circulation sur le territoire. Toutefois un des axes d'amélioration reste l'amélioration des méthodes d'extraction des nématodes et des acides nucléiques pour analyse. Les connaissances actuelles appliquées aux échantillons représentatifs pour la surveillance imposent des étapes longues, non automatisables et consommatrices de main d'œuvre. Une méthode directe d'extraction sur bois, pour les volumes d'échantillons adaptés (100 à 150 g de copeaux), serait une réelle amélioration du processus d'analyse.

Enfin toute méthode de détection précoce n'a de sens que dans le cadre d'un échantillonnage pertinent et fiable. Cet élément reste dans doute encore un axe d'amélioration pour une détection précoce. Un prélèvement au plus près de la possible contamination initiale, à savoir au niveau des houppiers, serait sans doute un meilleur garant d'une détection précoce, mais c'est sans compter sur les difficultés techniques que poserait ce type d'approche.

CONCLUSION

La détection précoce du nématode du pin repose d'une part sur une analyse régulière du couvert végétal des peuplements de pins pour détecter des dépérissements, et d'autre part sur une analyse très sensible en laboratoire.

La première approche par télédétection n'est pas encore appliquée dans le cadre de la surveillance et mériterait une étude plus approfondie pour évaluer les modalités de mise en œuvre pour la diversité ou une partie du territoire français. La télédétection à l'aide d'avion ou d'un drone pourrait être une option financièrement acceptable offrant une résolution adaptée.

La seconde approche est d'ores et déjà mise en œuvre en routine et permet une détection précoce et sensible de la présence du nématode. La PCR temps réel est appliquée en routine pour la surveillance du territoire. La différenciation moléculaire des nématodes vivants de ceux morts pourraient justifier des travaux méthodologiques complémentaires.

D'autres axes en lien plus global avec la détection du nématode justifieraient de bénéficier de travaux complémentaires, à savoir où et quand réaliser les prélèvements sur peuplements, mais aussi comment extraire les acides nucléiques des nématodes directement dans le bois sans passer par une étape de migration actives de *B. xylophilus*. Bien que ce dernier point ait été identifié plus largement en Europe, aucun des récents projets européens financés par l'UE n'a apporté de solution technique.

La détection de *B. xylophilus* reste une thématique de recherche active pour répondre aux différents acteurs de la filière et des services officiels.

BIBLIOGRAPHIE

Aikawa T., Kanzaki N., Kikuchi T. 2011 - Simple diagnosis of Pine Wilt Disease using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Sciences Edition), 35, 4, 148-149 [Chinese]

Anses, 2011a – MOA020 partie A version 1a : Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel sur bois de conifères. Disponible sur :
https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/LABO-Ft-MOA020A-Bursa-PCR_0.pdf

Anses, 2015 – MOA020 partie C version 1a : Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel dans un groupe d'insectes vecteurs. Disponible sur :
https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MOA020%20partie%20C%20version%201a_d%C3%A9tection%20PCR%20tps%20r%C3%A9el%20version%20finale.pdf

Cao A. X., Liu X. Z., Zhu S. F., Lu B. S. 2005 - Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology*, 95, 5, 566-571. doi: 10.1094/phyto-95-0566

François C., Castagnone C., Boonham N., Tomlinson J., Lawson R., Hockland S., Quill J., Vieira P., Mota M., Castagnone-Sereno P. 2007 - Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8, 803–809.

Huang L., Ye J.R., Wu X.Q., Xu X.L., Sheng J.M., Zhou Q.X. 2010 - Detection of the pine wood nematode using a real-time PCR assay to target the DNA topoisomerase I gene. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 1, 89-98.

Ju Y., Pan J., Wang X., Zhang H. 2014 - Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* infection in *Pinus massoniana* from hyperspectral data. *Nematology*, 16, 1997-1207.

Kanetani S., Kikuchi T., Akiba M., Nakamura K., Ikegame H. Tetsuka K. 2011 - Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var *amamiana* trees using a new detection kit. *Forest Pathology*, 41, 387–391.

Kikuchi T., Aikawa T., Oeda Y., Karim N., Kanzaki N. 2009 - A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99, 1365–1369.

Leal I., Green M., Allen E., Humble L., Rott, M. 2007 - Application of a real-time PCR method for the detection of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*, 9, 351–362.

Leal I., Foord B., Allen E., Campion C., Rott M., Green, M. 2013 - Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology*, 43, 104–114.

Leal I., Allen E., Foord B., Anema J., Reisle C., Uzunovic A., Varga A., James D. 2015 - Detection of living *Bursaphelenchus xylophilus* in wood, using reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Forest Pathology*, 45, 2, 134-148.

Liu N., Zhang X., Wang S., Huang Y.T. 2015 - Prediction of *Bursaphelenchus xylophilus* based on transpiration rate and spectral characteristics. *Journal of Northwest A & F University - Natural Science Edition*, 43, 6, 129-135. [Chinese]

Mota M., Braasch H., Bravo M.A., Penas A.C., Burgermeister W., Metge K., Sousa, E. 1999 - First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1, 727-734.

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase, T. 2000 - Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.

Wang L., Huang H.G., Zhang X., Luo Y., Shi J. 2008 - Monitoring of *Pinus massoniana* spatial pattern changes based on RS and GIS techniques. *Forestry Studies in China*, 10, 1, 32-35.

Ye W. M., Giblin-Davis R. M. 2013 - Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLOS ONE*, 8(11):e78804

Zaman S., Siddiquee S. U., Katoh M. 2010 - Damage analysis of pine wilt disease using GIS in Komagane City Forest, Nagano Prefecture, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture, Shinshu University*, 46, ½, 93-98.