



# Travaux de recherche sur les vecteurs de *Xylella*

Astrid Cruaud\*, P. Cruaud, S. Nidelet, E. Pierre, G. Genson, S. Puissant, J.-Y Rasplus, J.-P Rossi, S. Santoni, J.-C Streito.



# MISSION D'EXPERTISE SUR *XYLELLA FASTIDIOSA* EN CORSE (3 au 11 août 2015)

Rapport définitif (31 août 2015)

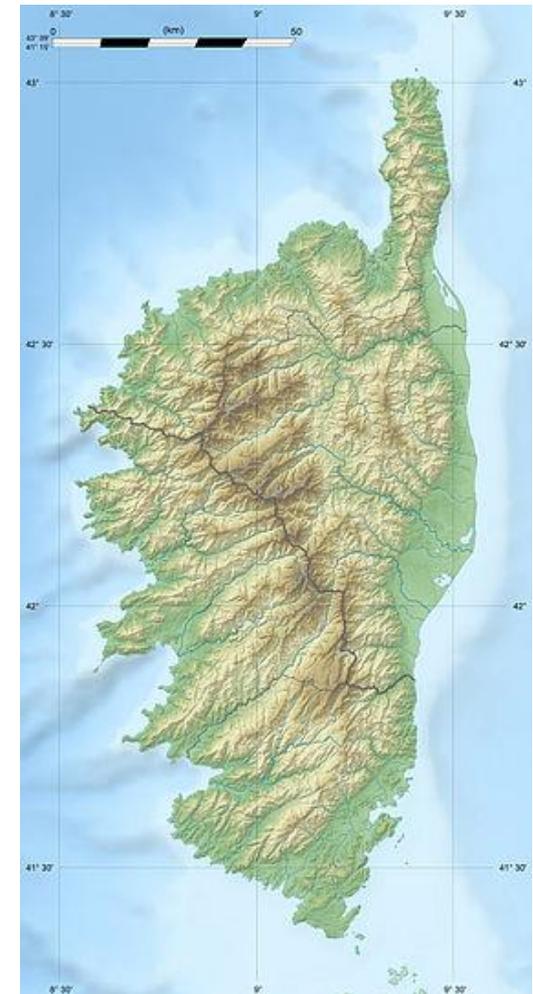
Gilbert Chauvel<sup>1</sup>, Astrid Cruaud<sup>2</sup>, Bruno Legendre<sup>3</sup>, Jean-François Germain<sup>4</sup>, Jean-Yves Rasplus<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MAAF, DGAL, SDQPV, 251, rue de Vaugirard 75732 Paris Cedex 15

<sup>2</sup> INRA, CBGP, 755 avenue du campus Agropolis CS 30016 34988 Montpellier-sur-Lez

<sup>3</sup> ANSES, LSV, Unité BVO, Equipe bactériologie, 7, rue Jean Dixmères 49044 Angers Cedex 01

<sup>4</sup> ANSES, LSV, 755 avenue du campus Agropolis CS 30016 34988 Montpellier-sur-Lez



# Convention *Xylella* DGAL – INRA (janv 2016- juill 2017)

**Objectif.** Adapter au cas de *Xylella fastidiosa* (Xf) des outils et méthodes de diagnostic et de prévision performants utilisés par l'INRA, puis les mettre à disposition de la DGAL et de l'ANSES pour la prévention et la gestion d'une crise sanitaire.

## Trois axes à développer :

**1) Identification et gamme d'hôte des souches bactériennes :** [INRA IRHS Angers]

Description génétique des souches. Outils de diagnostic performants, gamme d'hôte.

**2) Identification des vecteurs, de leurs plantes alimentaires et de la souche de Xf portée :**

Développer des méthodes à haut-débit (NGS). [INRA AGAP/CBGP Montpellier]

**3) Prévision et gestion du risque par la modélisation :**

Comprendre la diffusion Xf (dispersion, climat, paysage). [INRA CBGP Montpellier, BioSP Avignon ]

Cartographie des zones à risque potentiel.

## Participants :



# Les espèces vectrices potentielles

Aphrophoridae



*Aphrophora alni*



*Philaenus spumarius*

Cercopidae



*Cercopis larve*



*Cercopis intermedia*

## 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)

Graphocephala  
fennahi USA => UE



*Cicadella viridis*

Cicadellidae

Cicadidae



*Lyristes plebejus*



*Cicada orni*

# 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
- 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



*Graphocephala* sp



*Draeculacephala* sp



*Homalodisca liturata*

Cicadellidae



*Draeculacephala minerva*



*Graphocephala atropunctata*

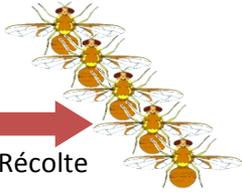
# Construire une base de données de barcode moléculaire pour une identification fiable des vecteurs européens de *Xylella*

## Liste d'espèces

Acleris gloverana (Walsingham)  
Acleris variana (Ferne)  
Aculops fuchsiae Keifer  
Aeolesthes sarta (Solsky)  
Agrilus planipennis Fairmaire  
Aleurocanthus spiniferus  
(Quaintance)  
Aleurocanthus woglumi Ashby  
Anastrepha obliqua (Macquart)  
Anastrepha fraterculus Wiedmann



Récolte



Nécessité de profiter des réseaux déjà en place et de les élargir ... piégeage

=> Documentation des occurrences des vecteurs, des variables d'environnement etc.

# Construire une base de données de barcode moléculaire pour une identification fiable des vecteurs européens de *Xylella*

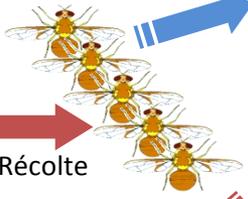
## Liste d'espèces

- Acleris gloverana (Walsingham)
- Acleris variana (Ferne)
- Aculops fuchsiae Keifer
- Aeolesthes sarta (Solsky)
- Agrilus planipennis Fairmaire
- Aleurocanthus spiniferus (Quaintance)
- Aleurocanthus woglumi Ashby
- Anastrepha obliqua (Macquart)
- Anastrepha fraterculus Wiedmann

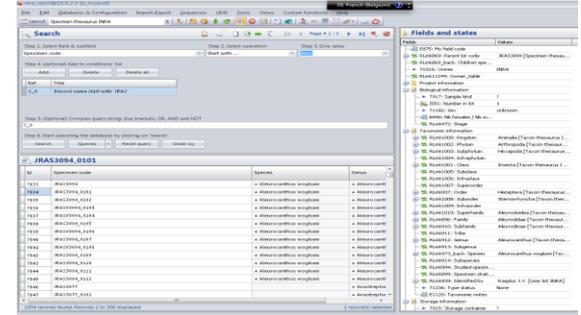
Spécimens en collection



Récolte



Identification par un spécialiste



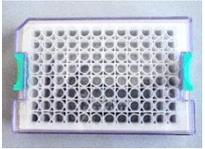
Mise en base de données et diffusion internet

Extraction non destructive



Amplification COI + nuDNA

Stockage DNAtèque



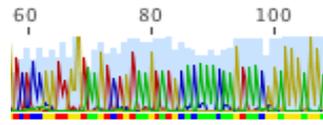
Protocoles disponibles



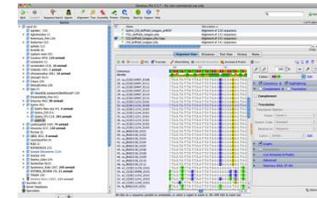
Identification des vecteurs

- ⇒ Une obligation de qualité
- ⇒ Une traçabilité absolue

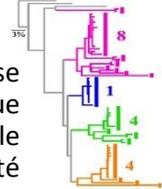
Séquençage



Correction Séquences 1<sup>er</sup> contrôle qualité



Barcoding with numts



Analyse phylogénétique 2<sup>ème</sup> contrôle qualité

Traçabilité

Contrôle qualité

Arthemis Home Search Identification tools Database information Contributors Sponsors Contact us

# Search on : Artemis Taxon thesaurus

Add condition Match on: All conditions Reset base condition(s) Switch to: Advanced Search Search

Search conditions (click to expand)

Collapse titles Export data

Diabrotica virgifera Show empty fields

Taxonomic information

Complete taxon name: **Diabrotica virgifera LeConte, 1858**

Taxonomic rank: Species

Classification: Animalia, Eumetazoa, Arthropoda, Hexapoda, Insecta, Coleoptera, Polyphaga, Cucujiformia, Chrysomeloidea, Chrysomelidae, Galerucinae, Luperini, Diabrotica

2 Associated records (click to hide): Diabrotica virgifera virgifera, Diabrotica virgifera zaeae

Taxon validity: **nomen valid**

Taxon bio-ecology

Host plant range: **Zea mays**

Taxon distribution

Biogeographical region (\*native): Palearctic

Taxon risk prediction

Phytosanitary statut: **Quarantine**

Quarantine priority: 1

EPPO List: **A2**

Taxon pictures:



Diabrotica virgifera (L.)  
Diabrotica virgifera / Jean-Yves Raspius

External resources

External resources: Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (DAISIE), Fauna Europaea (2013) version 2.6.2 [242590]

Specimens available

Specimen(s) available: 1. CCOC08905\_0101, 2. CCOC08906\_0101, 3. CCOC08907\_0101, 4. CCOC10991\_0101, 5. CCOC10991\_0102, 6. CCOC10991\_0103, 7. CCOC10991\_0104, 8. CCOC10991\_0105, 9. CCOC10992\_0101, 10. CCOC10992\_0102, 11. CCOC10992\_0103, 12. CCOC10992\_0104, 13. CCOC10992\_0105, 14. JRAS03324\_0101, 15. JRAS03324\_0102, 16. JRAS03324\_0103, 17. JRAS03327\_0401, 18. JRAS03327\_0402,

3

# Pairwise sequence alignment

I have read [the disclaimer](#) and I agree with the conditions and limitations associated with the usage of the software

Pairwise sequence alignment parameters

Minimum similarity to keep results (0-100%):  Gap creation penalty (1-100):

Minimum overlap to keep results (0-100%):  Gap extension penalty (1-10):

Minimum overlap for rating reward (0-100%):  Word size (1-256):

Maximum alignments to display (1-1000):  Penalty for a nucleotide mismatch:

Select sorting mode:

Reward for a nucleotide match:

Select the reference(s) file(s) to be used for the alignment:

<input checked="" type="checkbox"/>	Name	Location	Status	#Match(s) found
<input checked="" type="checkbox"/>	Sequence	Local	Reachable	

Paste sequence to align:

**1**

Start alignment

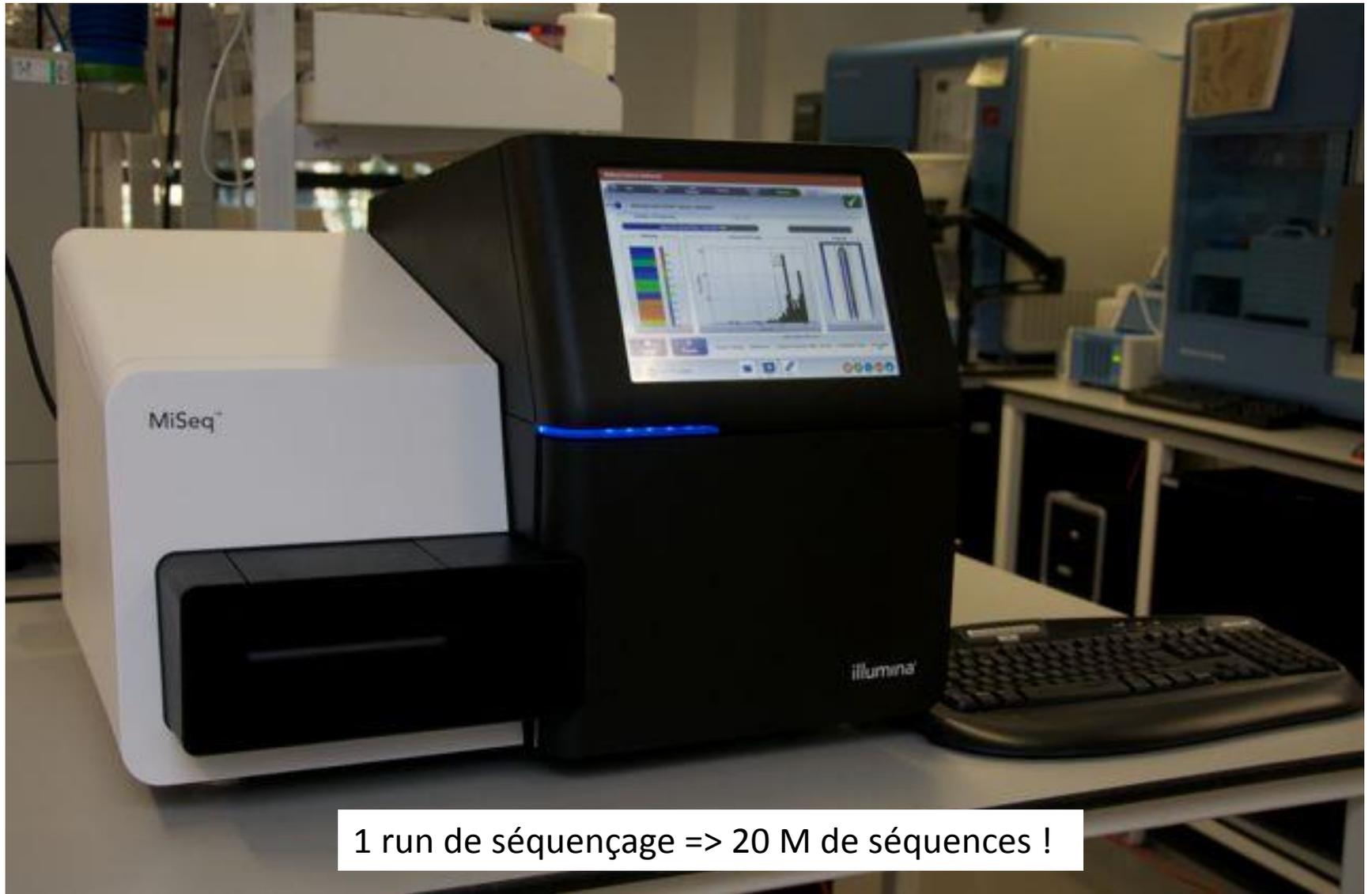
My data

```

JRAS03382_0204JRAS03382_0204_COIDiabrotica virgifera, nlink892:
CCOC08905_0101CCOC08905_0101_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC08906_0101CCOC08906_0101_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10181_0101CCOC10181_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10187_0101CCOC10187_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10184_0101CCOC10184_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10182_0101CCOC10182_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10180_0101CCOC10180_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10186_0101CCOC10186_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10178_0101CCOC10178_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10183_0101CCOC10183_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
JRAS03324_0101Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03324_0103Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03348_0201Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03348_0202Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03348_0206JRAS03348_0206_COIDiabrotica virgifera, nlink892:
CCOC10179_0101CCOC10179_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10185_0101CCOC10185_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
JRAS03348_0205Diabrotica virgifera, nlink892: COI
CCOC10203_0101CCOC10203_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
CCOC10202_0101CCOC10202_0101_COIDiabrotica virgifera virgifera,
JRAS03324_0102Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03348_0204Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03382_0201JRAS03382_0201_COIDiabrotica virgifera, nlink892:
JRAS03382_0202JRAS03382_0202_COIDiabrotica virgifera, nlink892:
JRAS03382_0203JRAS03382_0203_COIDiabrotica virgifera, nlink892:
CCOC10991_0102CCOC10991_0102_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10991_0103CCOC10991_0103_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10991_0104CCOC10991_0104_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10991_0105CCOC10991_0105_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10992_0101CCOC10992_0101_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10992_0102CCOC10992_0102_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10992_0103CCOC10992_0103_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10992_0104CCOC10992_0104_COIDiabrotica virgifera, nlink892
CCOC10991_0101CCOC10991_0101_COIDiabrotica virgifera, nlink892
JRAS03348_0203Diabrotica virgifera, nlink892: COI
JRAS03327_0308Diabrotica barberi, Diabrotica longicornis, nlink892: t
JRAS03327_0302Diabrotica barberi, Diabrotica longicornis, nlink892: t
JRAS03327_0304Diabrotica barberi, Diabrotica longicornis, nlink892: t
JRAS03327_0305Diabrotica barberi, Diabrotica longicornis, nlink892: t
JRAS03323_0202Diabrotica barberi, nlink892: COI
JRAS03323_0201Diabrotica barberi, nlink892: COI
JRAS03322_0303Diabrotica barberi, nlink892: COI
JRAS03327_0310Diabrotica barberi, Diabrotica longicornis, nlink892: t

```

**2**



1 run de séquençage => 20 M de séquences !

## Équation :

Nb d'individus analysés = 20 M de séquences / (nb de marqueurs \* profondeur)



- 1 marqueur pour l'identification du vecteur
- 1 marqueur pour détecter toutes les bactéries qu'il porte tests sur 300 échantillons (Xylella détectée ds Graphocephala USA)

2650 € / 2-2.5 semaines / 1 pers  
pipeline bioinfo OK à peaufiner

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

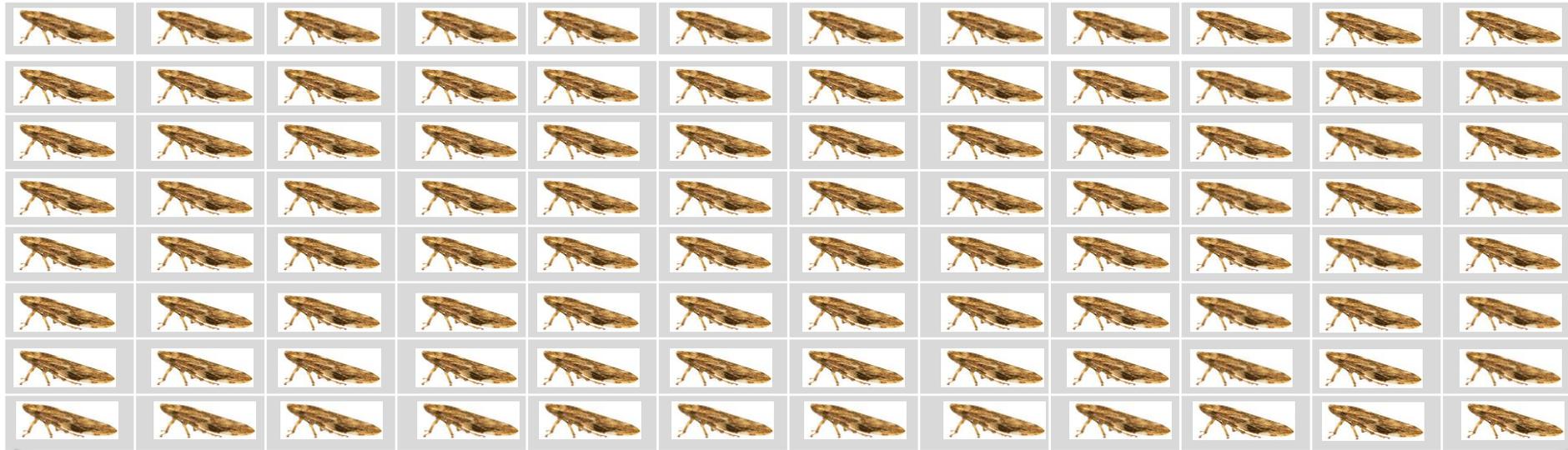
**Jusqu'à 1500 individus sur une douzaine de marqueurs.**

**On peut savoir qui est qui, qui porte quoi, qui a mangé quoi**

(applicable sur les plantes)

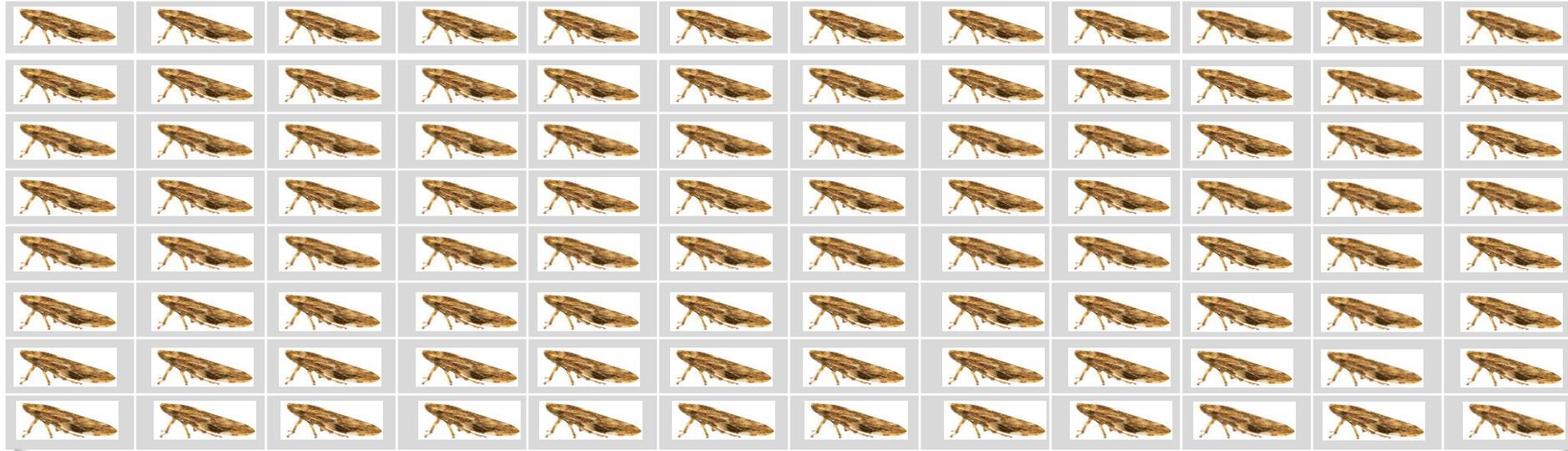
**Coût = 2.2€\*(nbind+2) + 90€\*nbmarqueurs\*nbind+2/96 + 1300€ seq (22k€ 1500 ind/12marqueurs)**

# Dispositif pour identifier les vecteurs de Xylella, diagnostiquer la présence de la bactérie et identifier la souche concernée

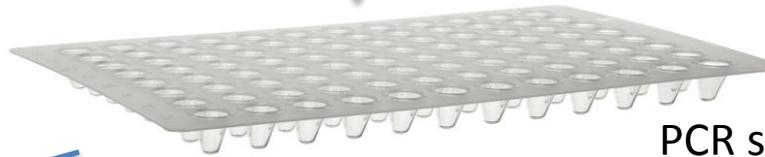


DNA extraction (Kit Qiagen)

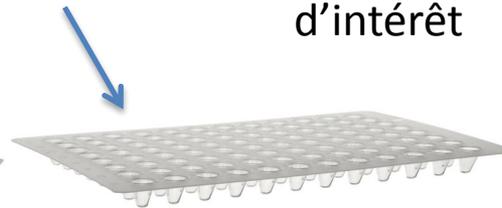
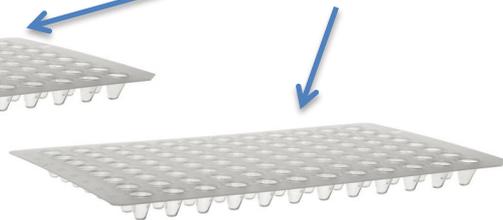




DNA extraction (Kit Qiagen)

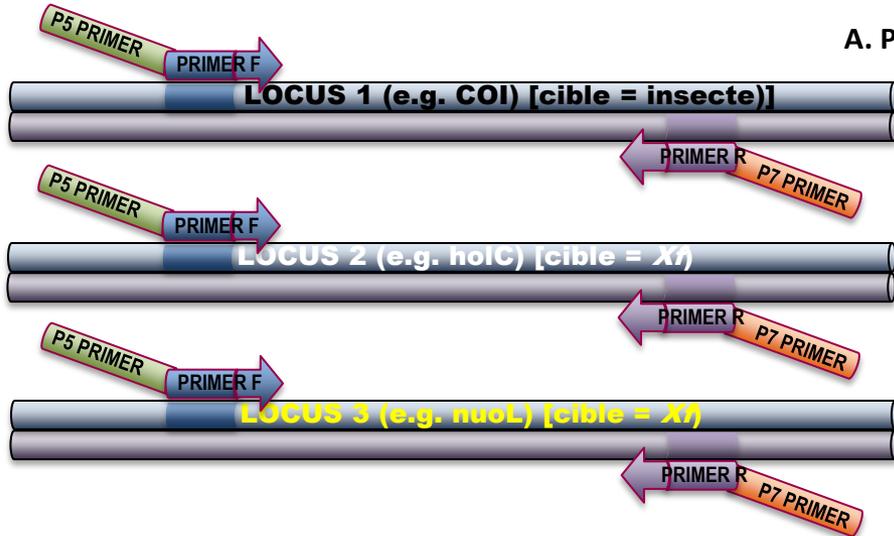


PCR sur les marqueurs  
d'intérêt



# Premiers tests COI + 16S

## A. Première étape de PCR



(A.) les loci d'intérêt sont amplifiés avec des amorces spécifiques qui possèdent une petite queue qui sert d'amorce (P5 primer) pour la seconde étape de PCR

## B. Seconde étape de PCR



(B.) les adaptateurs nécessaires à l'accrochage des amplicons sur les cellules du séquenceur sont ajoutés ainsi que des petits index (en rouge) qui vont permettre de différencier les échantillons entre eux.

# Quid des vecteurs récoltés en Corse pendant la mission d'expertise ?

Collecte de 1142 spécimens de vecteurs potentiels en Corse  
Plus une dizaine de spécimens près de Nice

*Aphrophora alni* (2)

*Aphrophora pectoralis* (335)

*Neophilaenus sp* (1)

*Lepyronia coleoptrata* (42)

*Cicadella viridis* (758)

*Cicada orni* (4)

*Philaenus spumarius* (10) (Nice)

Témoins positifs ?



# Collaboration avec Rodrigo Krugner (USDA) (\*)

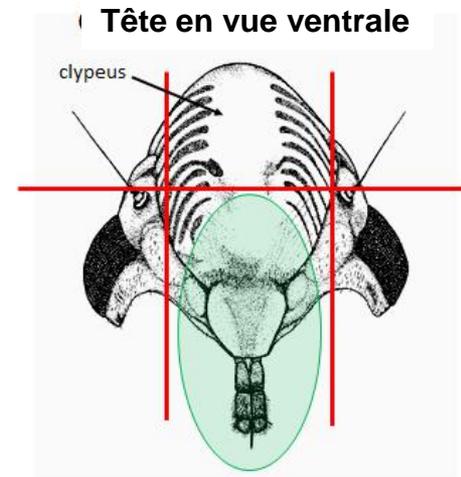
*Homalodisca vitripennis* (Californie) (120) vecteurs contaminés

- Envoi d'*Homalodisca* élevées au laboratoire puis alimentées sur plantes contaminées (différentes souches et sous-espèces de Xf) et conservées au congélateur depuis 2011-2012.
- Dissection des têtes (voir figure).
- Suppression des yeux sur certains spécimens pour tester la présence d'inhibiteurs de PCR dans les yeux => faux négatifs
- Temps long de préparation des individus



20 ind. pour les souches suivantes :

Xf strains	subspecies
M12	multiplex
Stag's Leap	fastidiosa
RH	multiplex
Dixon	multiplex
Temecula	fastidiosa
M23	fastidiosa



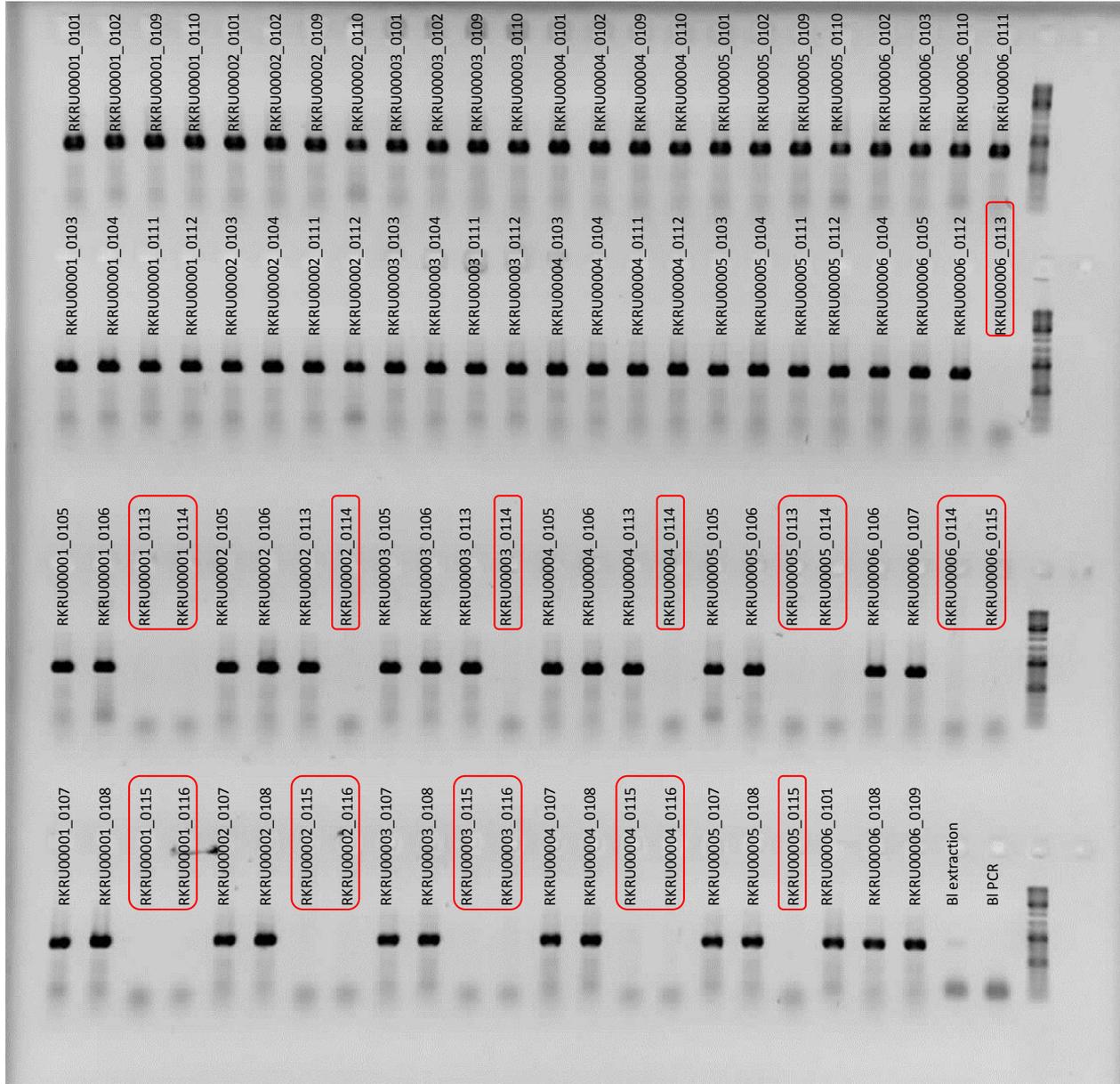
Étape 1. Séquençage Miseq COI + 16S bactérien

(\*) Crop Diseases, Pests, and Genetics Research Unit  
San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, CA, USA

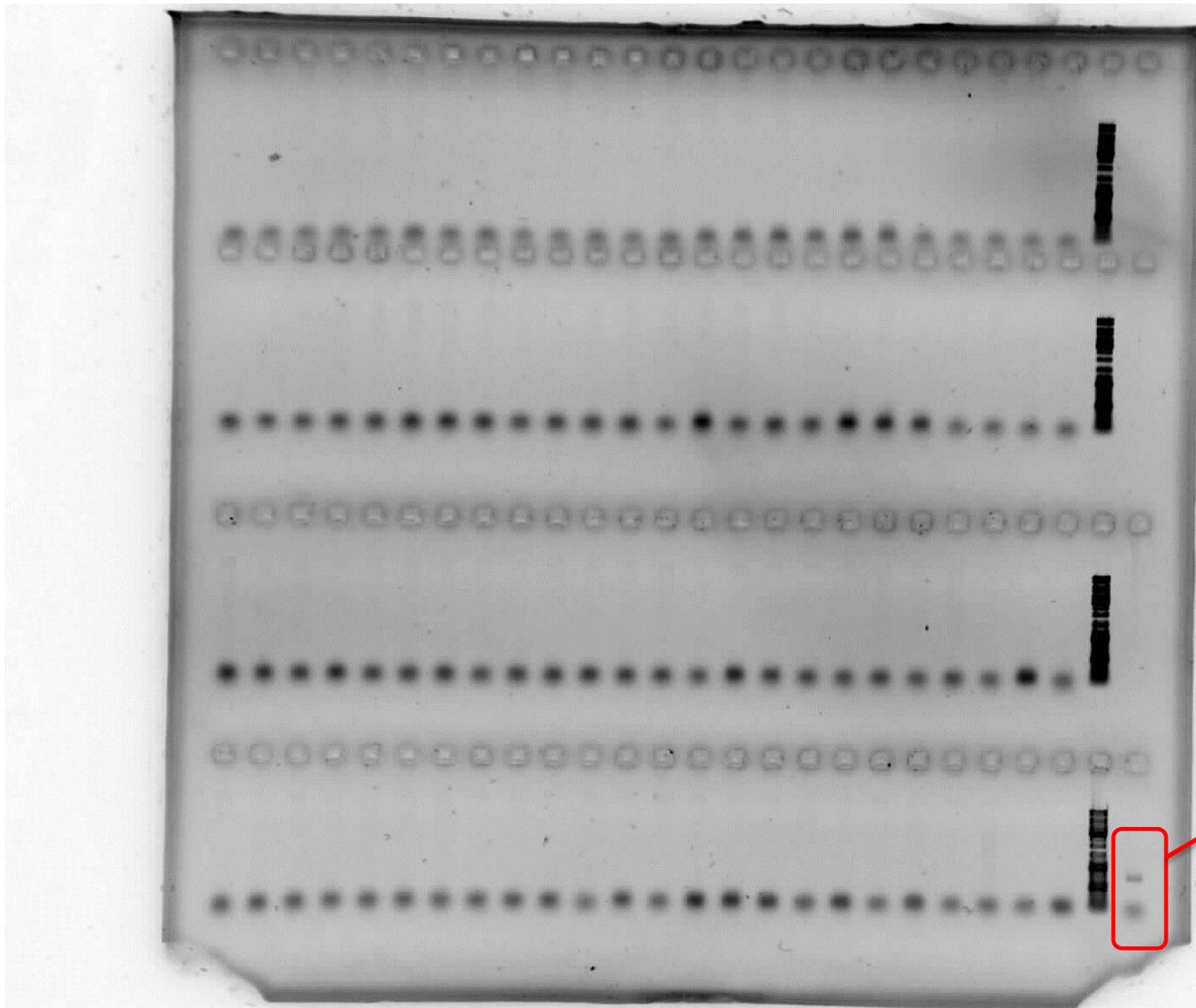
Étape 1. Séquençage Miseq COI + 16S bactérien

Résultats arrivés lundi ...

PCR du Gène COI (pour l'identification des vecteurs) sur la plaque 1 contenant les témoins américains. Les carrés rouges montrent les résultats négatifs lorsque les yeux ne sont pas enlevés



Pas de souci d'amplification avec une autre enzyme !



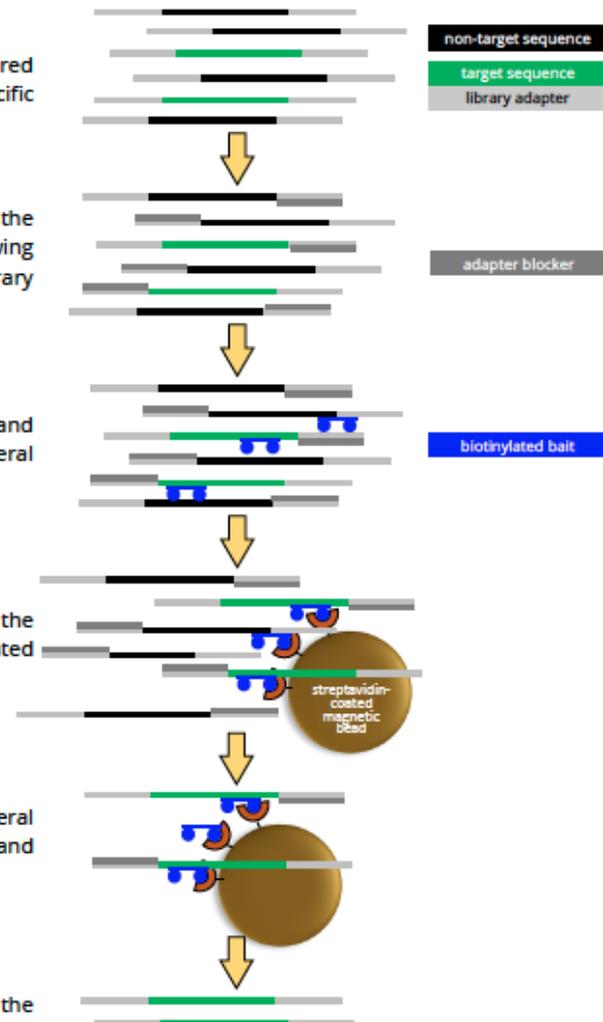
Résultats des PCR  
sur le locus MLST gltT  
Pour l'ensemble des  
*Cicadella viridis*  
collectées en Corse +  
4 *Philaenus spumarius*  
de Nice

Témoin positif  
(*H. vitripennis* infecté  
par *Xf ssp multiplex*)

# Est ce qu'on peut faire mieux ?

- Capture
- Plus sensible
- Moins versatile
- Moins chère

- 1) DNA sequencing library is heat-denatured in the presence of adapter-specific blocking oligonucleotides
- 2) Library and blockers are dropped to the hybridization temperature, allowing blockers to hybridize to the library adapters
- 3) Biotinylated RNA baits are introduced and allowed to hybridize to targets for several hours
- 4) Bait-target hybrids are pulled out of the solution with streptavidin-coated magnetic beads
- 5) Beads are stringently washed several times to remove non-hybridized and nonspecifically-hybridized molecules
- 6) Captured DNA library is released from the beads and amplified



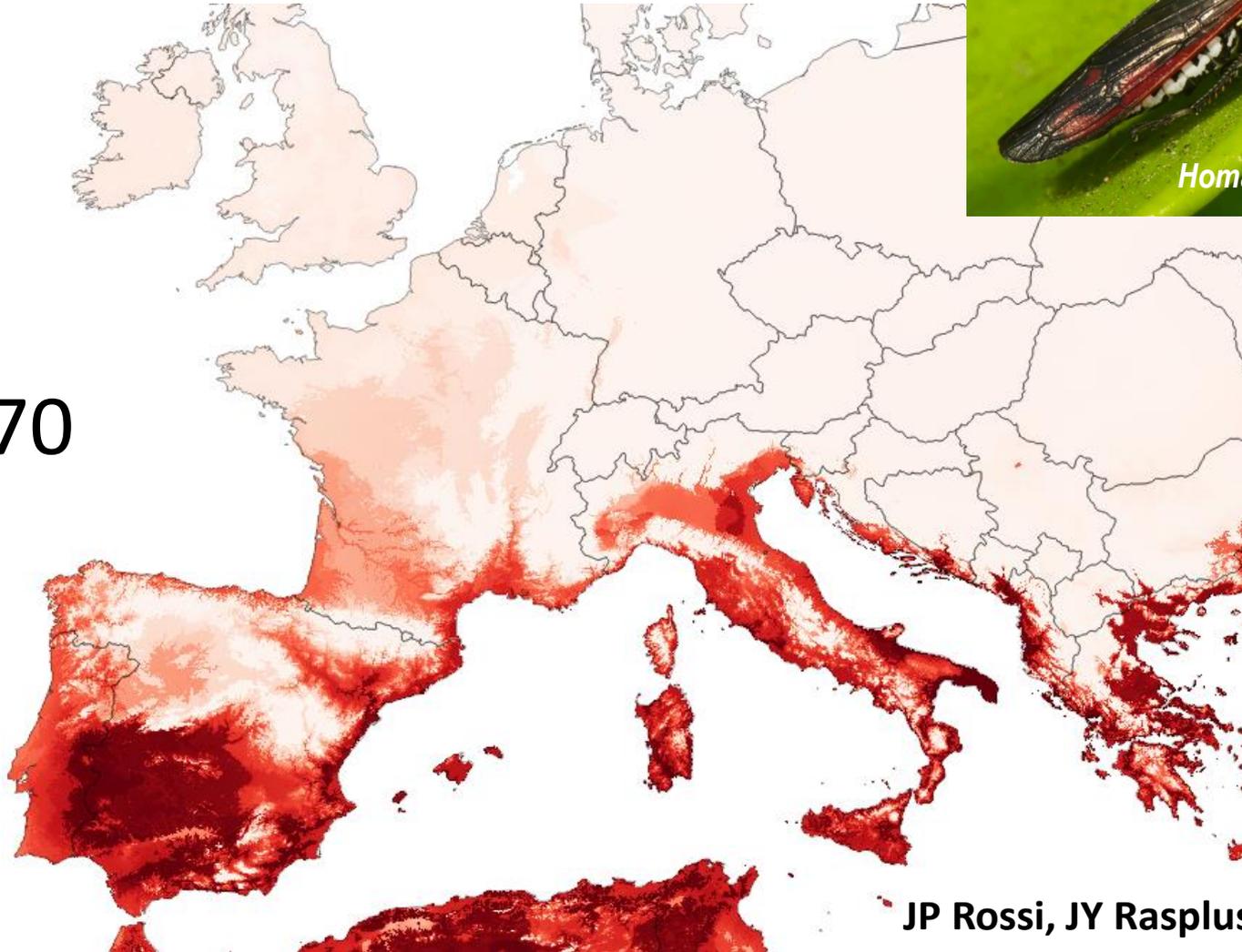
# Prévision et gestion du risque par la modélisation



# Distribution potentielle d'*Homalodisca vitripennis* en Europe et extension sous un scénario de changement climatique



2070





**MERCI POUR**

**VOTRE ATTENTION !**

Astrid Cruaud\*, P. Cruaud, S. Nidelet, E. Pierre, G. Genson, S. Puissant, J.-Y Rasplus, J.-P Rossi, S. Santoni, J.-C Streito.

