



Nouvelles technologies pour la détermination des vecteurs et de leur état de contamination

Jean-Yves Rasplus, Perrine Cruaud, Gwenaëlle Genson, Martin Godefroid, Anne-Alicia Gonzalez, Sabine Nidelet, Eric Pierre, Stéphane Puissant, Jean-Pierre Rossi, Sylvain Santoni, Jean-Claude Streito et Astrid Cruaud,



CB
GP INRA - UMR CBGP, Montpellier
<http://www6.montpellier.inra.fr/cbcp>

- Directeur de Recherches (INRA)
- Groupe de Recherche **ICERYA** au CBGP: **I**dentification, **C**aractérisation et **E**volution des insectes **R**avageurs et auxiliaires en **s**ylvi- et **A**griculture
- Taxonomie et phylogénie des insectes
- Caractérisation des trichogrammes: TriPTIC
- Systématique et évolution d'insectes associés aux figuiers
- Génétique des populations d'insectes en danger
- Diagnostic moléculaire des ravageurs et auxiliaires: QBOL



Philaenus spumarius (Aphrophoridae)



Graphocephala atropunctata (Cicadellidae)



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 pour 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]

2) Identification des vecteurs, de leurs plantes alimentaires et de la souche de Xf portée : [INRA AGAP/CBGP Montpellier]

3) Prévision et gestion du risque par la modélisation. [INRA CBGP Montpellier, BioSP Avignon]

Participants :



Projet H2020 – XF-ACTORS

Xylella fastidiosa Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy

Un an après, Xf est détectée dans plusieurs départements, nous devons anticiper le risque, et vite acquérir de la connaissance sur ses vecteurs et leur biologie

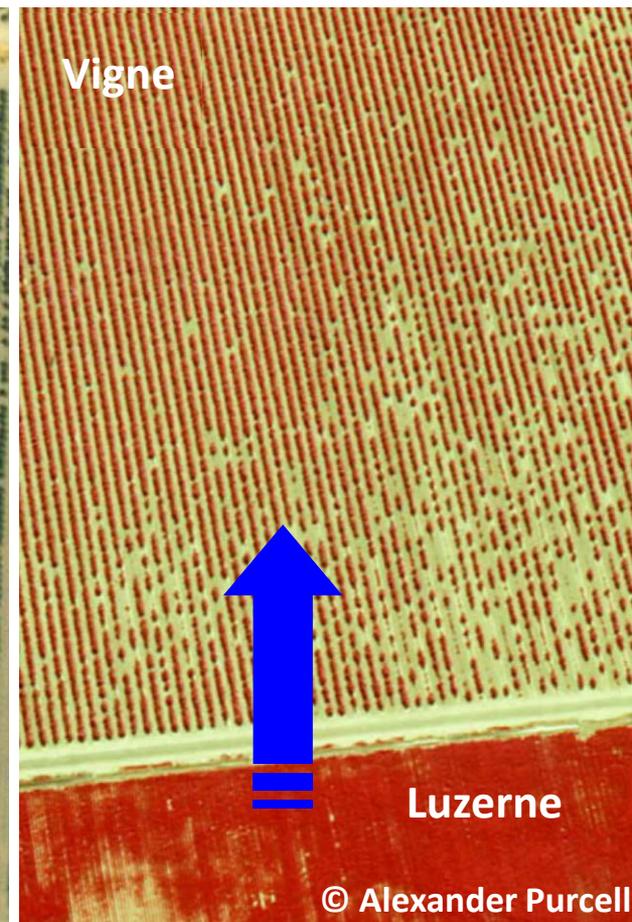
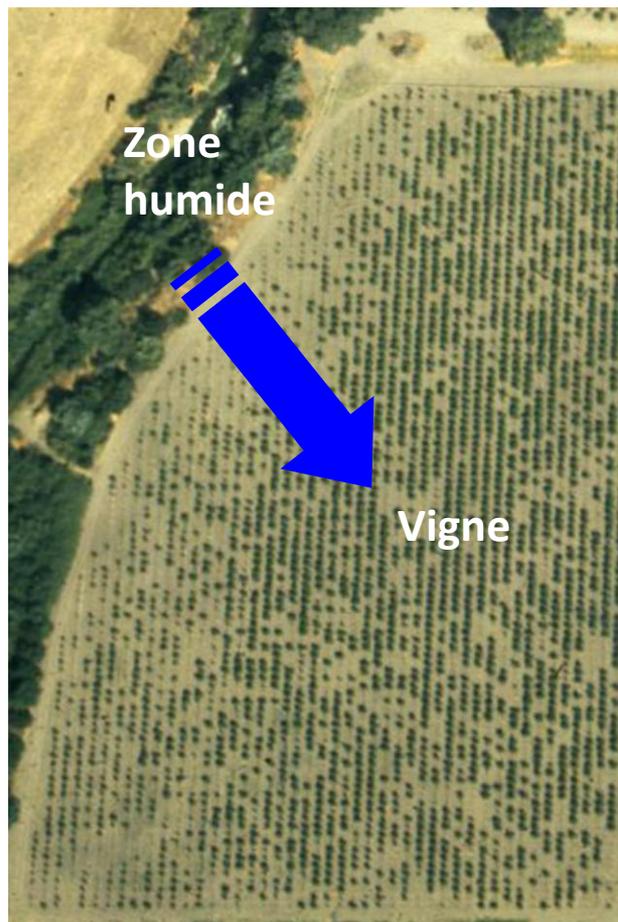
Apprendre à cultiver avec Xf

Aux USA:

flux de vecteurs/maladie de zones humides => cultures

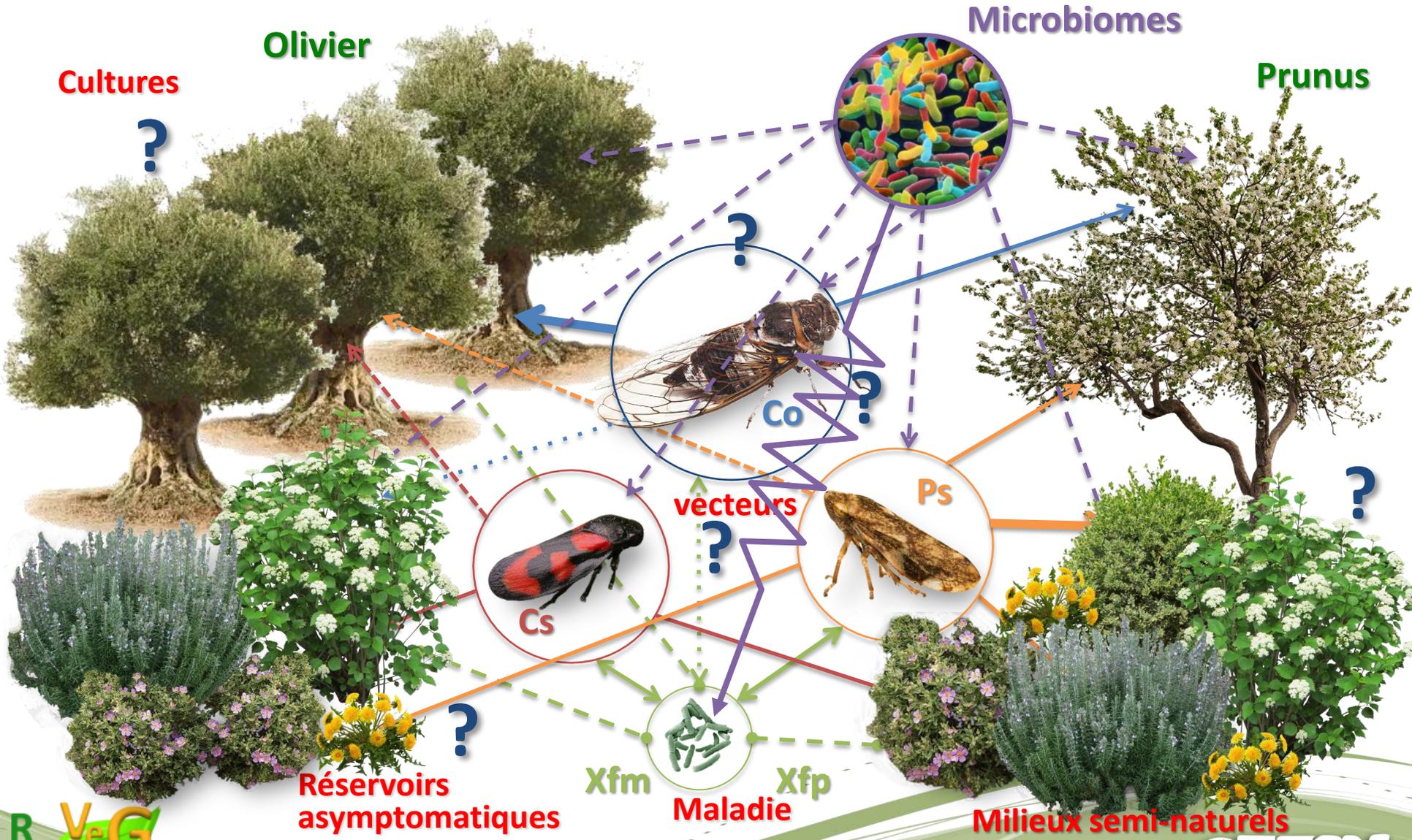
Environnement immédiat, plantes etc. => influence

Proposer des actions pour affaiblir son impact



© Alexander Purcell

Eco-épidémiologie de *Xylella fastidiosa*. Comprendre les interactions complexes entre plantes, vecteurs, microbiomes et Xf ...



Quelle est la composition des communautés de vecteurs ? => **collecte et quantification**
Comment varient-elles dans le temps ? => **récence des observations**
Comment varient-elles géographiquement ? => **suivi sur un réseau de parcelles observées**

Cultures



Olivier

Prunus

?

Cicada



Cicadella



Cercopis



Aphrophora



Neophilaenus



Philaenus



Milieus semi-naturels



Sur quelles plantes s'alimentent préférentiellement les vecteurs ?

Comment varient leurs préférences alimentaires entre localités ? => **dispositif d'étude**

En fonction de la composition floristique des parcelles ? => **parcelles caractérisées bota**

En fonction de ses plantes-hôtes ? (= plantes de développement) => **rechercher**

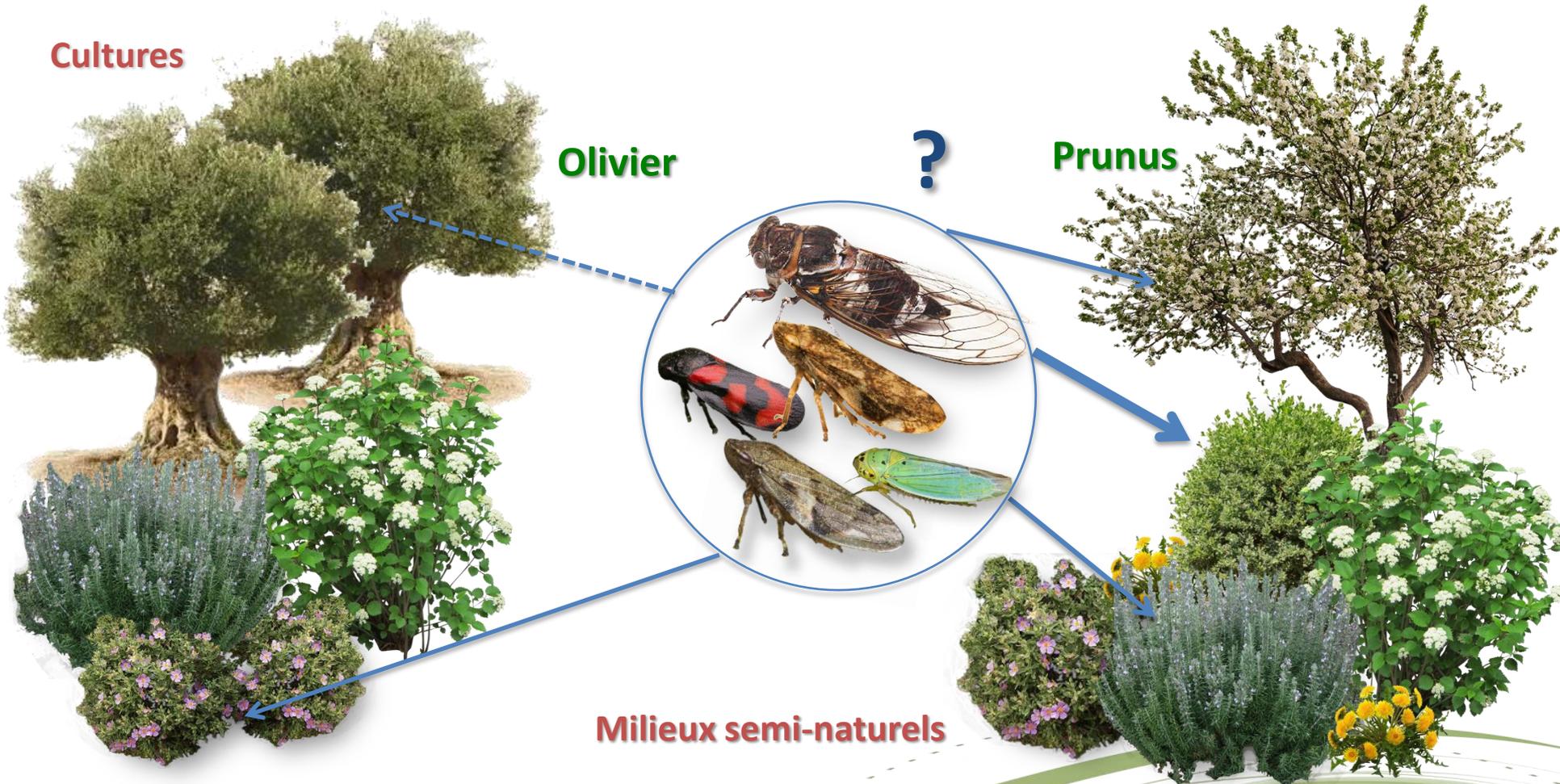
Cultures

Olivier

?

Prunus

Milieux semi-naturels

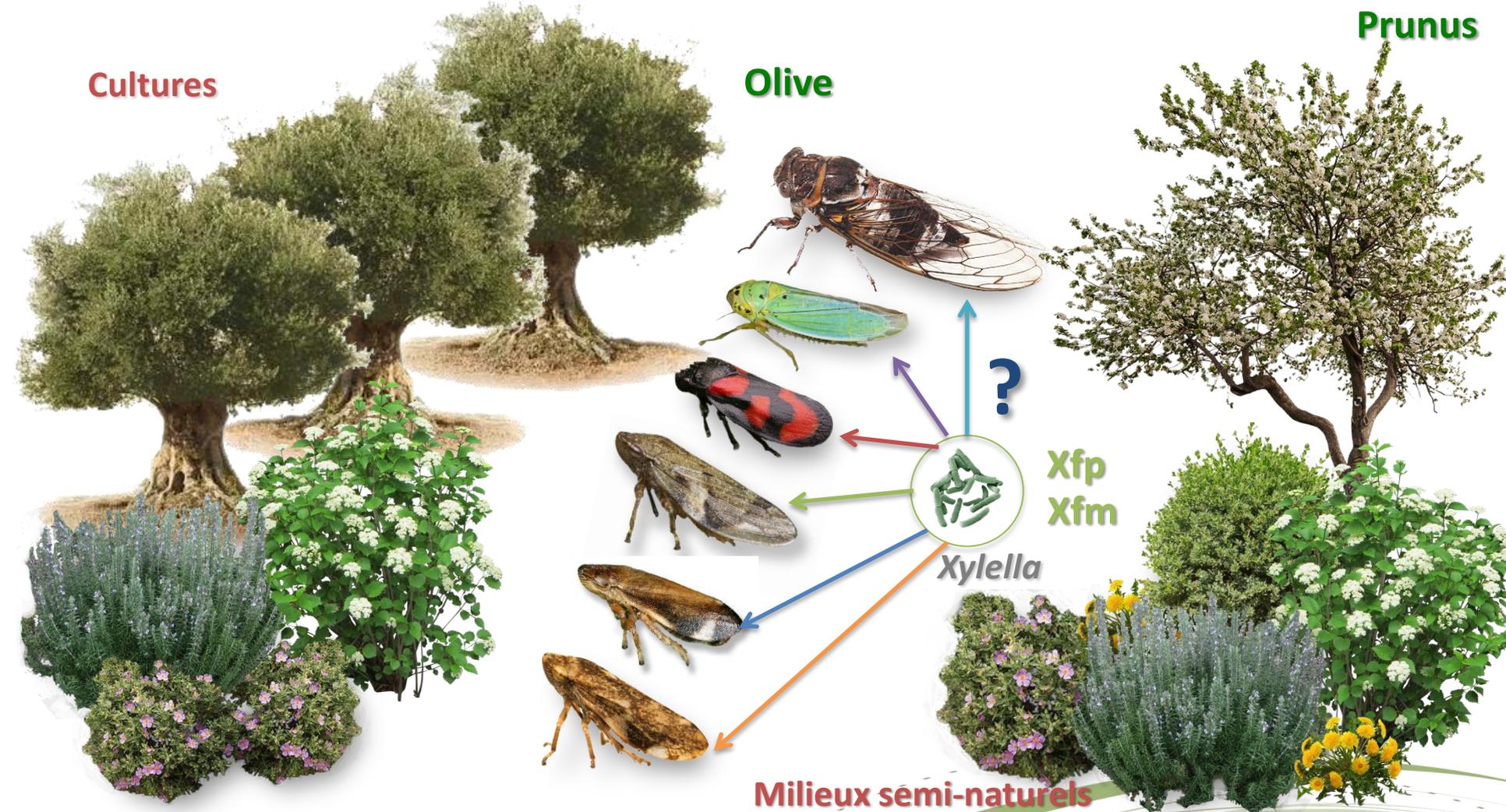


Quelles vecteurs portent Xf, quelle ssp? => screening HD dans différentes parcelles
Quelle proportion d'individus, portant la/les ssp de Xf ? => nombre significatif d'individus
La communauté vectrice de Xf change-elle au cours du temps ? => suivi dans le temps

Cultures

Olive

Prunus



Urgence => réponse la plus rapide possible

Multiples interactions, parfois inconnues => analyser conjointement

Nombreux écosystèmes contaminés => approche volumique obligatoire

CHOIX DE METHODES MOLECULAIRES A HAUT DEBIT

⇒ **Changement d'échelle**

⇒ **Permettent d'analyser de multiples vecteurs dans de multiples habitats**

⇒ **Nécessité de mise au point**

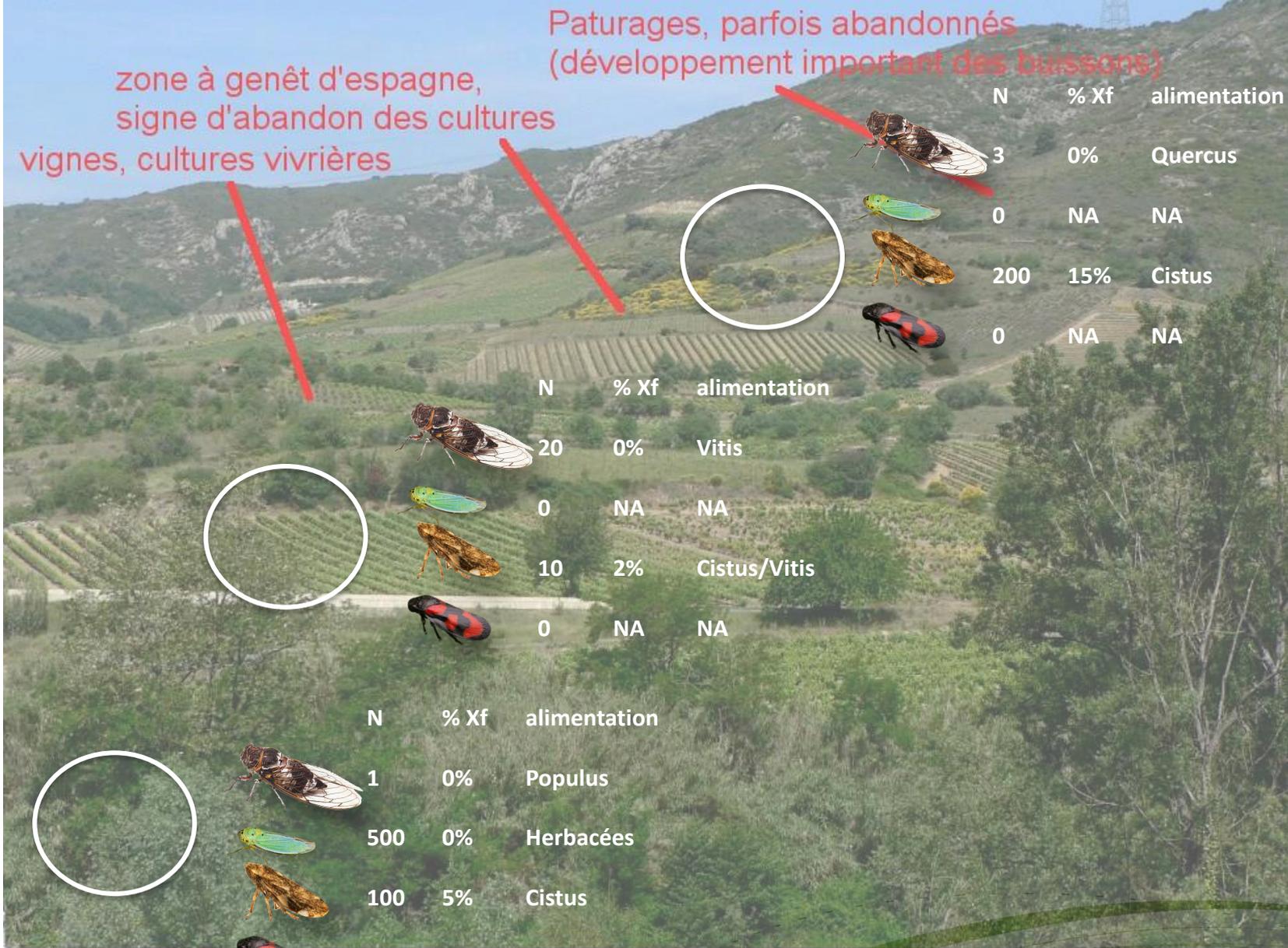
Difficile, peu de laboratoires maitrisant ces méthodes, peu d'études similaires ...

Jamais appliqué à l'identification des sèves ingérées par des vecteurs => au delà de la puissance de l'outil ???

Innovant => nécessité de mise au point, d'optimisation, développement de pipeline analytique de novo

zone à genêt d'Espagne,
signe d'abandon des cultures
vignes, cultures vivrières

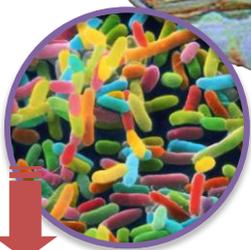
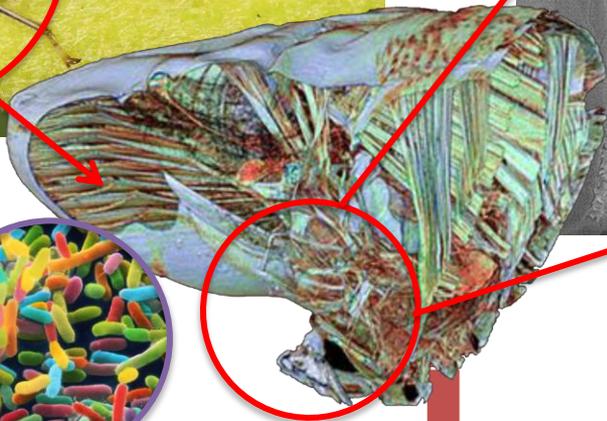
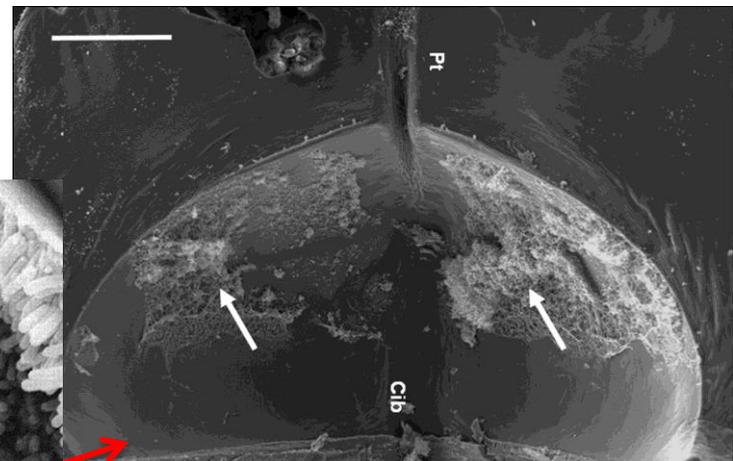
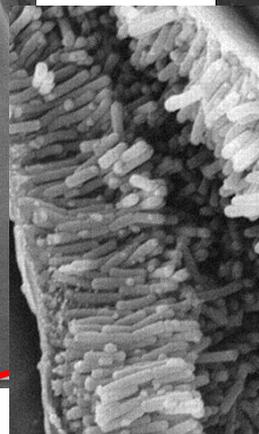
Paturages, parfois abandonnés
(développement important des buissons)



Insecte

tête

cibarium/précibarium



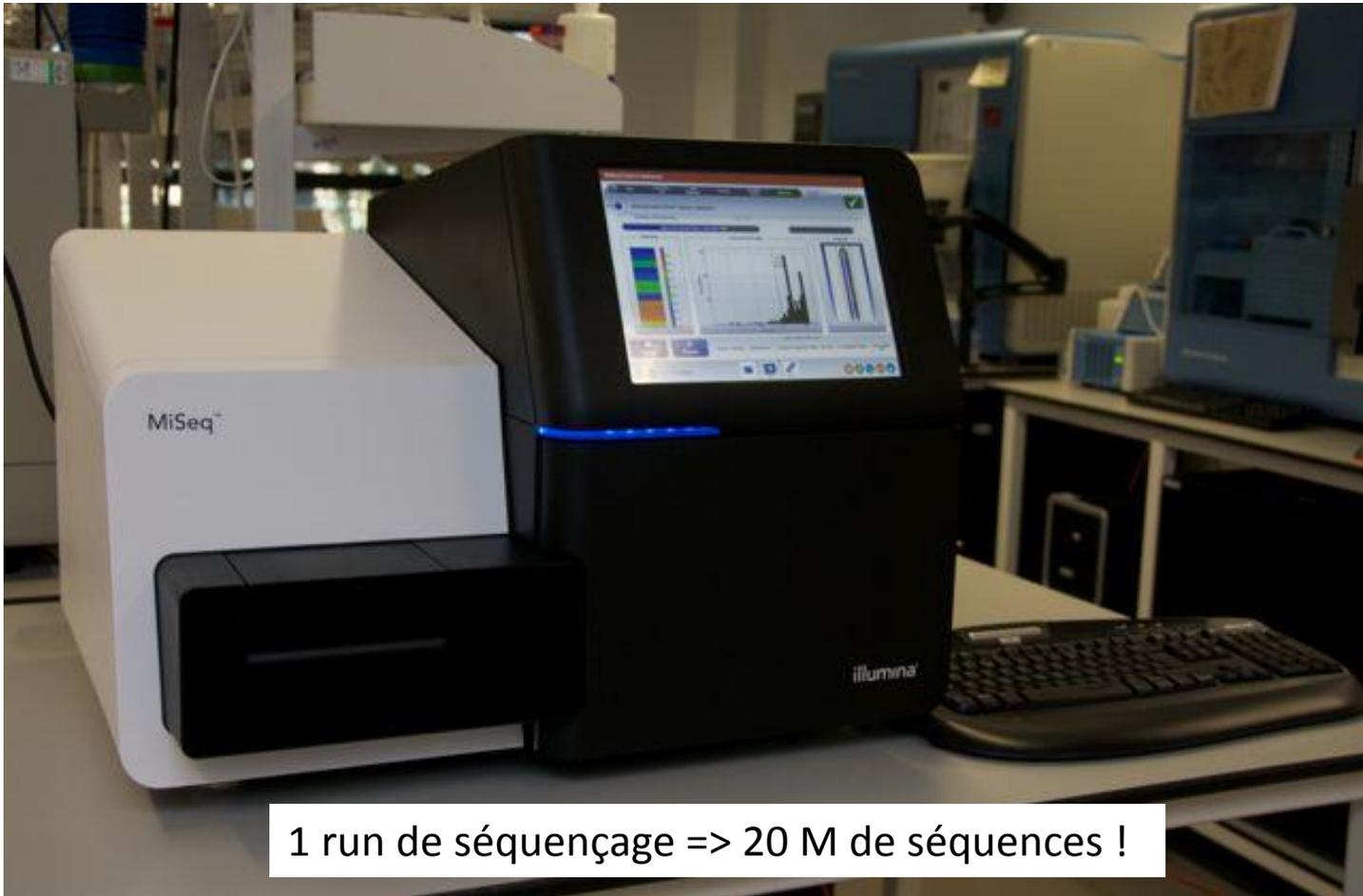
ADN microbiome

ADN vecteur

ADN *Xylella*

ADN plante ingérée

Quantité ADN



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

- 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)

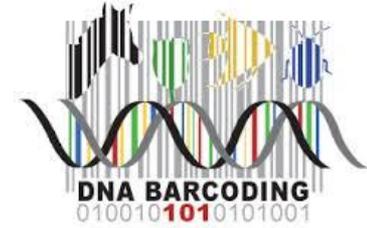


Importance d'avoir des bases de données de référence moléculaire => permettent d'identifier les séquences réalisées

Elles doivent être de qualité et complètes => identification par des spécialistes, toutes les espèces => réseaux de collectes collaboratifs

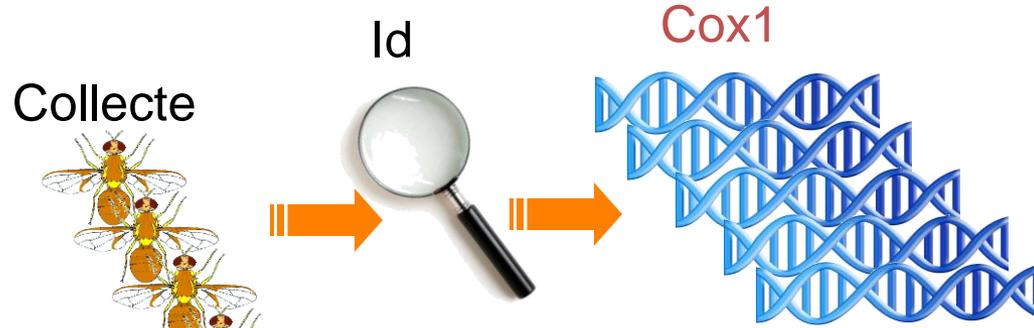
Elles permettent d'identifier les séquences en masse => analyses quantitatives

Le principe du code-barre moléculaire: 1) construction de la base de données

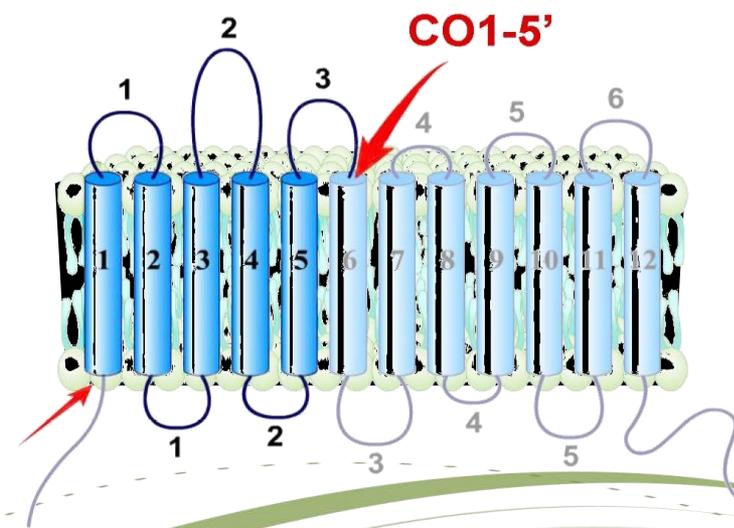
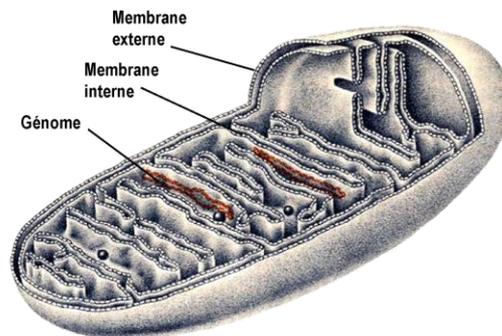


Liste d'espèces

- 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
- Anastrepha ludens (Loew)
- Anastrepha suspensa Loew
- Blitopertha orientalis (Waterhouse)
- Anoplophora chinensis (Thomson)
- Anoplophora glabripennis (Motschulsky)
- Anthonomus bisignifer Schenkling
- Anthonomus eugenii Cano
- Anthonomus grandis Boheman
- Anthonomus quadrigibbus Say
- Anthonomus signatus Say
- Aonidiella citrina (Coquillett)
- Arrhenodes minutus (Drury)
- Aschistonyx eppoi Inouye
- Aulacaspis yasumatsui Takagi
- Bactrocera cucumis (French)
- Bactrocera cucurbitae Coquillett
- Bactrocera tryoni (Froggatt)
- Bactrocera tsuneonis (Miyake)
- Bactrocera zonata (Saunders)
- Bemisia tabaci (Gennadius) & biotype B
- Cacoecimorpha pronubana Hübner
- Cacyreus marshalli Butler
- Carneocephala fulgida Nottingham
- Carposina niponensis (Walsingham)
- Cephalcia lariciphila (Wachtl)
- Ceratitis capitata Wiedemann



Construction d'une matrice validée = base de données



Le principe du code-barre moléculaire: 2) utilisation de la base de données

MATRICES

Validées

Cox1

Cox1

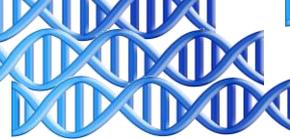
Méthodes de comparaison
et d'assignation

- BLAST (-)
- Distance overlap (+)
- NJ et Bootstrap (+)

Séquençage



Comparaison



Identification
Informations
Liens

Arthemis Home Search Identification tools Database information Contributors Sponsors Contact us

Search on : Artemis Specimens

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

Search conditions (click to expand)

Collapse titles Export data

JRAS03236_0112 Show empty fields

Record's Management

Unit Manager: CBGP

Owner: INRA **3**

Biological information

Sample kind: Specimen

Number in lot: 1

Stage: adult

Taxonomic information

Taxon: Graphocephala atropunctata

Identified by: Rasplus Jean-Yves



Taxon pictures:

Collected by: 1. Cruaud Astrid, 2. Rasplus Jean-Yves

Sampling notes: Faugeage Graphocephala atropunctata

Biogeographical region: Nearctic

Sampling locality: California (en)

Sampling locality notes: Laguna Beach

Geographic coordinates: (33.5443°; -117.7925°; 21.0000) ± ? km (Hide map)

Molecular data

Sequenced tissue: non destructive entire specimen

Extraction information: Qbol_P13_C10

Available DNA: yes

Arthemis Home Search Identification tools Database information Contributors Sponsors Contact us

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%): 0
 Minimum overlap to keep results (0-100%): 50
 Minimum overlap for rating reward (0-100%): 85
 Maximum alignments to display (1-1000): 50
 Select sorting mode: Rating

Gap creation penalty (1-100): 12
 Gap extension penalty (1-10): 2
 Word size (1-256): 20
 Penalty for a nucleotide mismatch: -1
 Reward for a nucleotide match: 1

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

Data on Xf vectors will be available soon at:
<http://arthemisdb.supagro.inra.fr/>

Pairwise Results Clustering results

agglomerative clustering: UPGMA

2

My data

```

JRAS03236_0112Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0111Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0110Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0109Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0108Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0107Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0103Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0102Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0101Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0104JRAS03236_0104_COIGraphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03236_0105Graphocephala atropunctata, nlink892: COI
JRAS03339_0106Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03339_0105Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03339_0104Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03339_0103Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03339_0102Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03339_0101Graphocephala fennahi, nlink892: COI
JRAS03220_0104Graphocephala, nlink892: COI
JRAS03220_0101Graphocephala, nlink892: COI
JRAS03220_0106Graphocephala, nlink892: COI
JRAS03220_0103Graphocephala, nlink892: COI
JRAS03220_0102Graphocephala, nlink892: COI
JRAS03220_0105Graphocephala, nlink892: COI
  
```

Fiche produite par la base INRA Arthemis, après un Blast sur une espèce

Search on : Taxon thesaurus INRA

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

Search conditions (click to expand)

Collapse titles Export data

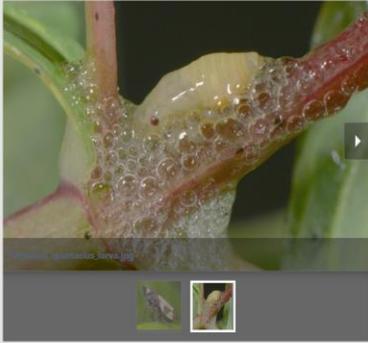
Philaeus spumarius Show empty fields

Taxonomic information

Complete taxon name	Philaeus spumarius (Linnaeus, 1758)
Taxonomic rank	species
Classification	Animalia, Eumetazoa, Arthropoda, Hexapoda, Insecta, Hemiptera, Cicadomorpha, Cercopoidea, Aphrophoridae, Philaeus
Associated records	None
Taxon validity	nomen valid
Junior synonyms	1. Cicada leucophthalma, 2. Cicada leucophthalmus, 3. Cicada spumaria, 4. Philaeus leucophthalmus, 5. Piyelus spumarius
Common name(s) (en)	common froghopper, meadow spittlebug
Common name(s) (fr)	aphrophore écumeuse
Taxon bio-ecology	
Trophic range	Polyphagous
Host plant range	1. Aster, 2. Berberis, 3. Calendula, 4. Campanula, 5. Chrysanthemum, 6. Coreopsis, 7. Dianthus, 8. Fragaria, 9. Geum, 10. Hyssopus officinalis, 11. Lavandula, 12. Lavandula intermedia (hyb.), 13. Malva, 14. Medicago, 15. Medicago sativa, 16. Melissa officinalis, 17. Origanum vulgare, 18. Phlox, 19. Phlox, 20. Populus, 21. Rosa, 22. Rudbeckia, 23. Silene, 24. Solidago, 25. Trifolium, 26. Vitis vinifera
Pest of	Agriculture and Ornamental
Taxon distribution	
Biogeographical region (native)	1. Afrotropical, 2. Australasian, 3. Nearctic, 4. Palearctic
World distribution	1. Albania, 2. Austria, 3. Açores, Região Autónoma dos (pt), 4. Balears (es) Balears (ca), 5. Belgium, 6. Bosnia and Herzegovina, 7. Bulgaria, 8. Canada, 9. Canarias (es), 10. Corse (fr), 11. Croatia, 12. Cyprus, 13. Czech Republic, 14. Denmark, 15. Estonia, 16. Finland, 17. France, 18. Germany, 19. Gibraltar, 20. Greece, 21. Hungary, 22. Ireland, 23. Italy, 24. Krib (el), 25. Latvia, 26. Lithuania, 27. Macedonia, 28. Malta, 29. Moldova, Republic Of, 30. Netherlands, 31. New Zealand, 32. Norway, 33. Poland, 34. Portugal, 35. Romania, 36. Russian Federation, 37. Sardegna (it), 38. Sicilia (it), 39. Slovakia, 40. Slovenia, 41. Spain, 42. Sweden, 43. Switzerland, 44. Turkey, 45. Ukraine, 46. United Kingdom, 47. United States
Occurrence (French mainland & Corsica)	Frequent
Taxon economical impact	
Pest rank (France)	Medium noxious

Taxon iconography

Taxon pictures:



External resources

External resources:

ATRI + M, Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (DAISIE).
Fauna Europaea (2013) version 2.6.2 [239414]. INPN.
Soulier-Perkins, A. (2016) COOL - Cercopoidea Organized On Line [Accessed - 10 February 2016]

Specimens available

Specimens available:

1. CCOC01827_0101, 2. CCOC01828_0101, 3. EPE00052_0401, 4. EPE00196_0901, 5. EPE00196_0902, 6. JSTRO1341_01, 7. JSTRO1409, 8. JSTRO1410_01, 9. JSTRO1446, 10. JSTRO1460, 11. JSTRO1975_01, 12. JSTRO2027_01, 13. JSTRO2041_01, 14. JSTRO2045_01, 15. JSTRO2079_01, 16. JSTRO2104, 17. JSTRO2121, 18. JSTRO2130, 19. JSTRO2208, 20. JSTRO2634, 21. JSTRO2634_0101, 22. JSTRO2634_0102, 23. JSTRO2634_0103, 24. JSTRO2765, 25. JSTRO2765_0101, 26. JSTRO2765_0102, 27. JSTRO2806, 28. JSTRO2806_0101, 29. JSTRO2808, 30. JSTRO2808_0101, 31. JSTRO2809, 32. JSTRO2809_0101, 33. JSTRO2816, 34. JSTRO2816, 35. JSTRO2818_0101, 36. JSTRO2843_01, 37. JSTRO2843_0101, 38. JSTRO2851, 39. JSTRO2851_0102, 40. JSTRO2936

Factsheet information

Author name:	Pierre Eric
Creation date:	20/01/2014
Last update:	10/02/2016

ARTHEMIS DB@ISE
an Arthropod Ecology, Molecular Identification and Systematics

SOFTWARE COPYRIGHT
© 1999-2015 BioWare SA NV
Powered by BioMACK3.net

EPE00196_0902 Show empty fields

Record's Management

Unit Manager:	CBGP
---------------	------

Owner

Owner:	INRA
--------	------

Biological information

Sample kind:	Specimen
Number in lot:	1
Stage:	adult

Taxonomic information

Taxon:	Philaeus spumarius
--------	--------------------

Identified by:

Identified by:	Pierre Eric
----------------	-------------

Identification date:

Identification date:	20/08/2015
----------------------	------------

Storage information

Preservative method:	Alcohol 95°
Preservative_stage:	Good
Depository:	CBGP
Storage container:	vial

Sampling information

Obtained from mass-rearing facilities?:	no
Sampling date start:	25/05/2013
Collected by:	Pierre Eric
Sampling method:	Beating
Habitat:	Garden
Host plant:	Juglans regia
Sampling locality:	Kribi (el)
Sampling locality notes:	Askifou : Village centre

Geographic coordinates:

(35.2919°, 24.1781° 710 0000) ± 7 km (Hide map)



Molecular data

Available DNA:	yes
----------------	-----

Développement d'une librairie de barcodes multigéniques plantes pour identifier les sèves ingérées par les vecteurs

Collaboration :

L Hugot (CNBC, Conservatoire Botanique Corse)

Récupérer les gènes des bases de données actuelles (matK, rbcL, ITS, trnL)

Compléter par un échantillonnage en Corse

Récolte de matériel, séchage CaSO₄ ou zéolite

⇒ **identification massive des sèves ingérées par les vecteurs**

⇒ **identification des plantes utilisées pour se nourrir par les vecteurs**



Utilisation des bases de données existantes pour les bactéries

⇒ **identification des bactéries du tube digestif des vecteurs**

⇒ **identification de *Xylella***



Home SILVAngs Browser Search Aligner Download Documentation Projects FISH & Probes Jobs Contact

SILVA

Welcome to the SILVA rRNA database project

A comprehensive on-line resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data.

SILVA provides comprehensive, quality checked and regularly updated datasets of aligned small (16S/18S, SSU) and large subunit (23S/28S, LSU) ribosomal RNA (rRNA) sequences for all three domains of life (*Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*).

SILVA are the official databases of the software package ARB.

For more background information → [Click here](#)

SILVA 126 - web release (Ref datasets and ARB files not updated)

	SSU Parc	LSU Parc
Release date	04.04.2016	04.04.2016
Aligned rRNA sequences	5,366,469	645,932

SILVAngs



Check out our new service for Next Generation Amplicon data

SILVA Tree Viewer

The SILVA Tree Viewer is a web application to browse and query the SILVA guide trees.

A technical preview is available at www.arb-silva.de/treetviewer



News

15.09.2016

SILVA training course: From Primer to Paper

From Primer to Paper: Training in Biodiversity Analysis using NGS Amplicon Data - Application now open. Please follow the link for more information on the course content, registration, and payment.

11.09.2016

Sneak Preview: SILVA release 128

The first statistics for SILVA release 128. The SILVA 128 release can be expected for October 2016.

01.09.2016

SILVA/SILVAngs Job Opening

You are interested to work on an internationally renowned project outside of the classical computer science tasks? We are looking for a Web-developer or Programmer with Ideas, Expertise and Motivation to support the SILVA team.

29.08.2016

First version of the SILVA Tree Viewer online

The brand new SILVA Tree Viewer is a web application to browse and query the SILVA guide trees. A technical preview is now available for testing and feedback.

[go to Archive ->](#)

SILVA SSU / LSU 123 - full release

	SSU Parc	SSU Ref	SSU Ref NR	LSU Parc	LSU Ref
Minimal length	300	1200/900	1200/900	300	1900
Quality filtering	basic	strong	strong	basic	strong
Guide Tree	no	no	yes	no	yes
Release date	23.07.15	23.07.15	23.07.15	23.07.15	23.07.15



Welcome to PubMLST - Public databases for molecular typing and microbial genome diversity.

- [Databases](#)
- [Download MLST definitions](#) - allelic profiles and sequences from all publicly accessible databases
- [BIGSdb](#) - software that runs most of the databases on this site
- [Documentation](#) - user and curator guides for BIGSdb
- [MLST schemes hosted on other sites](#)
- [Information about all species MLST databases and published schemes](#)
- [Recent publications that use or mention MLST](#)
- [News and updates](#)
- [Site map](#)
- [Policy document](#)
- [RESTful Application Programming Interface \(API\)](#)
- [International mirrors](#) of this site: [Primary](#) | [NL1](#) | [NO1](#) | [UK2](#) | [UK4](#) | [US1](#)

Please [contact us](#) if you would like us to host a MLST database for a particular organism, or have a request for new functionality.

The primary PubMLST site is hosted at [The Department of Zoology](#), University of Oxford, UK and is funded by The Wellcome Trust.

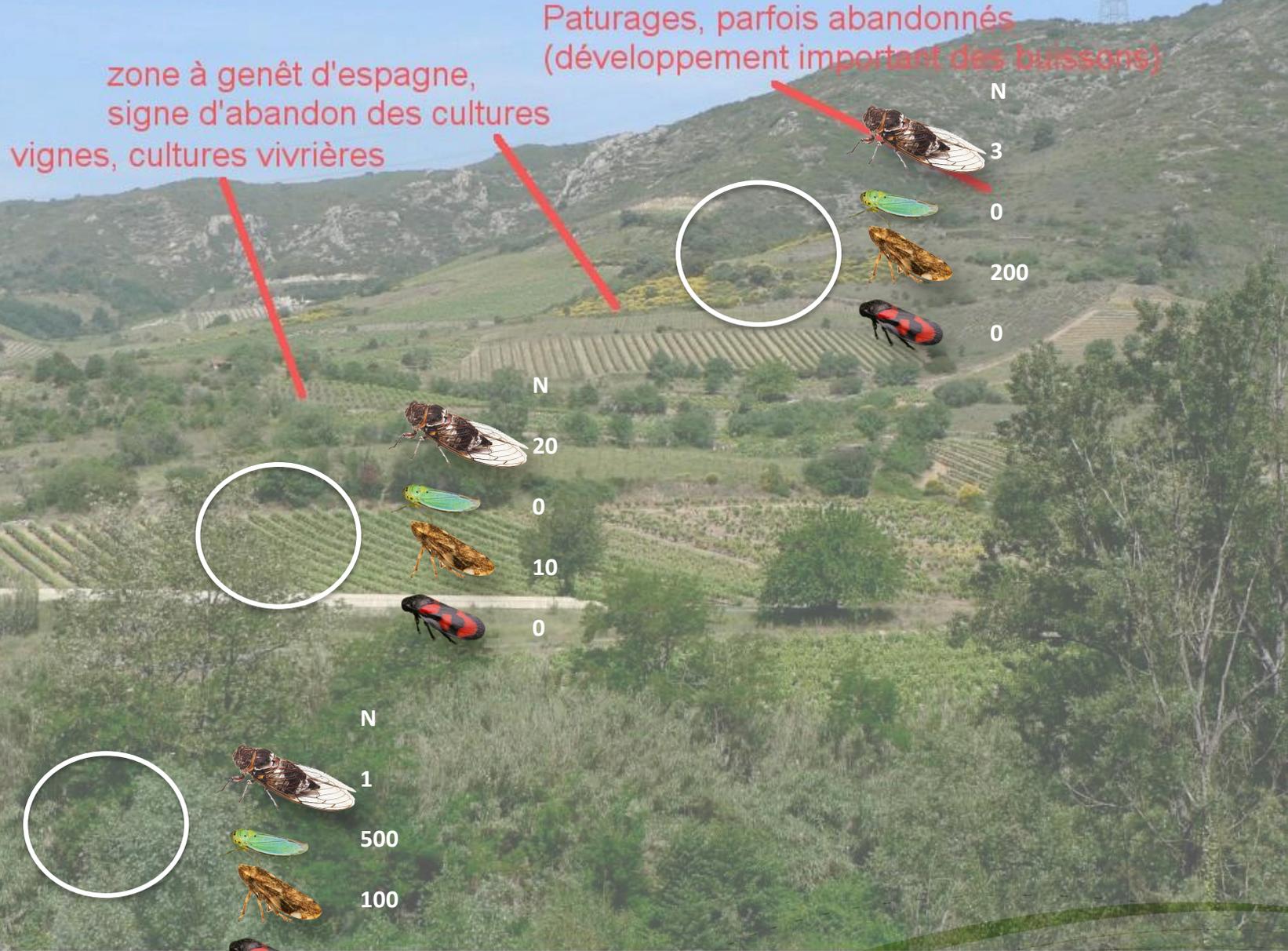


Paris – 16 septembre 2016

Séminaire : *Xylella fastidiosa* un an après ?

Connaissances acquises et perspectives de recherche et développement







Structurer un réseau de parcelles => **descriptif parcelles, botanique, pédologique**
Plusieurs réseaux en parallèle: FREDON (P. Reynaud, ANSES), professionnels Oliviers
(Continent, AFIDOL + Corse), DSF (Santé des forêts), professionnels Arbres fruitiers

afidol => **nombre significatif de parcelles**



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



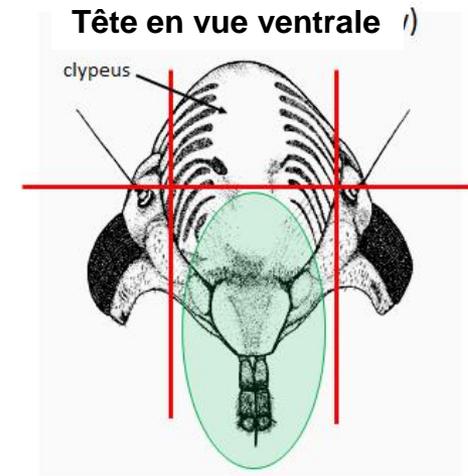
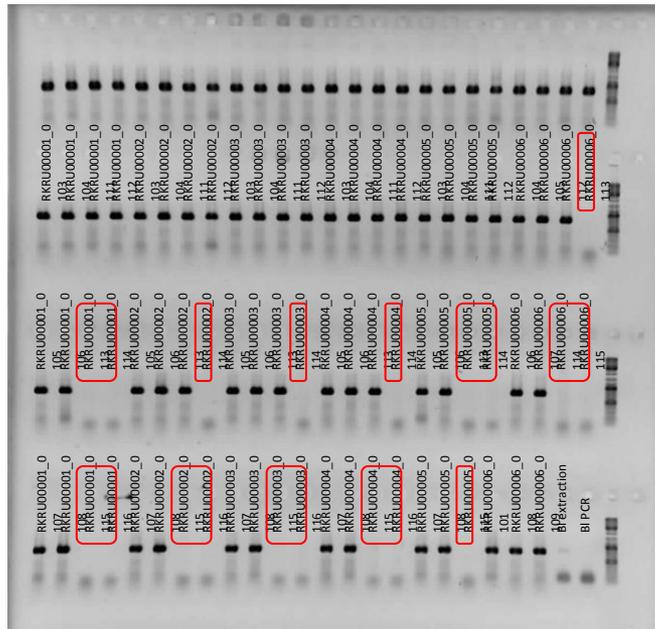
DNA extraction (Kit Qiagen)



Amplification des loci MLST dans les vecteurs (Corse et Nice) et dans les vecteurs positifs américains

PCR deCOI (identification des vecteurs)

Les cadres rouges montrent l'absence d'amplification lorsque les yeux du vecteurs sont laissés => nécessité d'utiliser une Polymérase différentes qui n'est pas sensible aux inhibiteurs



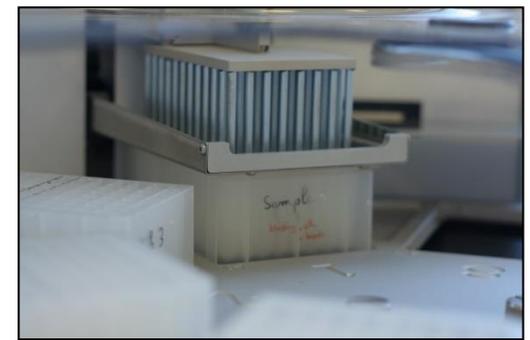
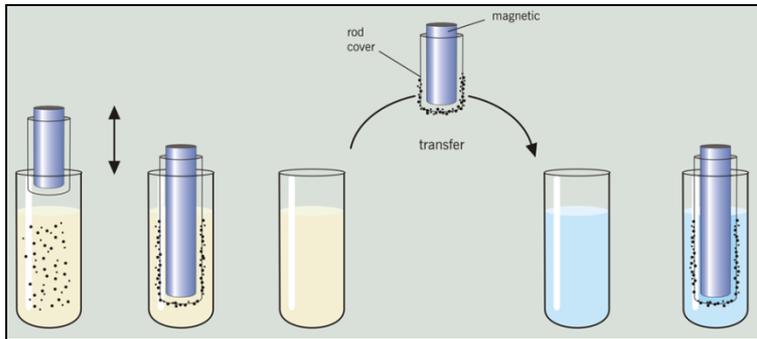
Mise au point d'une technique d'extraction/purification d'ADN total de vecteurs

Différentes optimisations

Etapes de purification des ADN « robotisable » grâce à l'utilisation de billes métalliques magnétiques et du robot KingFisher.

Adaptées au traitement de 2 x 96 échantillons en simultané.

Automatisation / augmentation du rendement / qualité de l'ADN

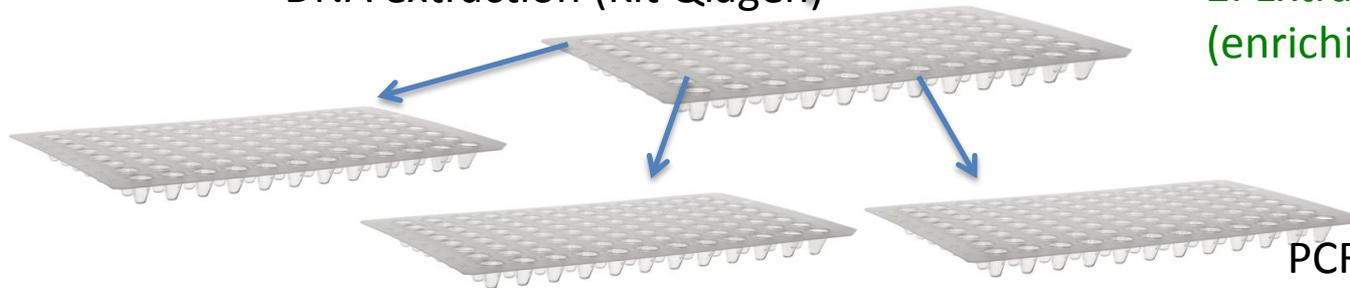


Dispositif pour identifier les vecteurs de *Xylella*, diagnostiquer la présence de la bactérie et identifier la souche concernée



DNA extraction (Kit Qiagen)

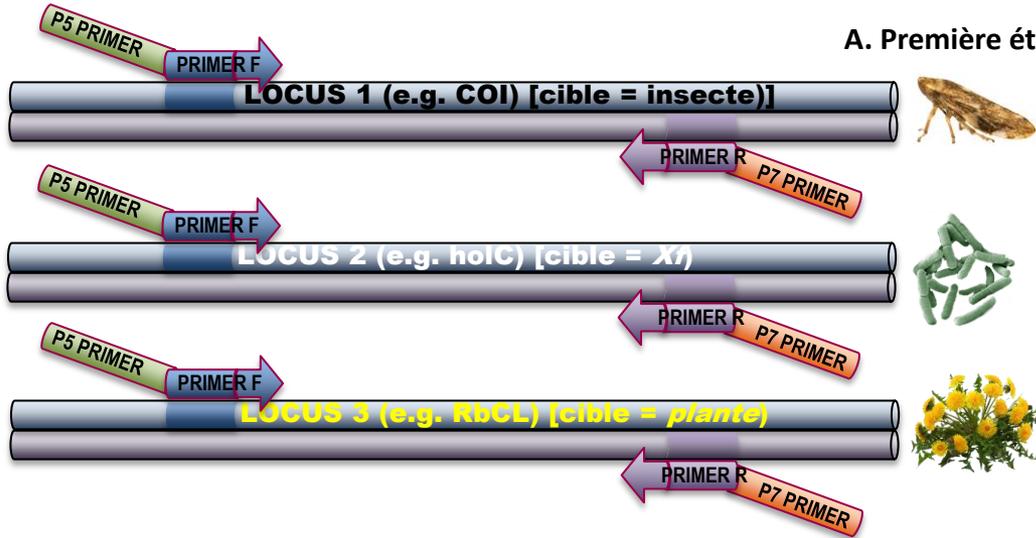
2. Extraction de la / des cibles (enrichissement)



PCR sur les marqueurs d'intérêt

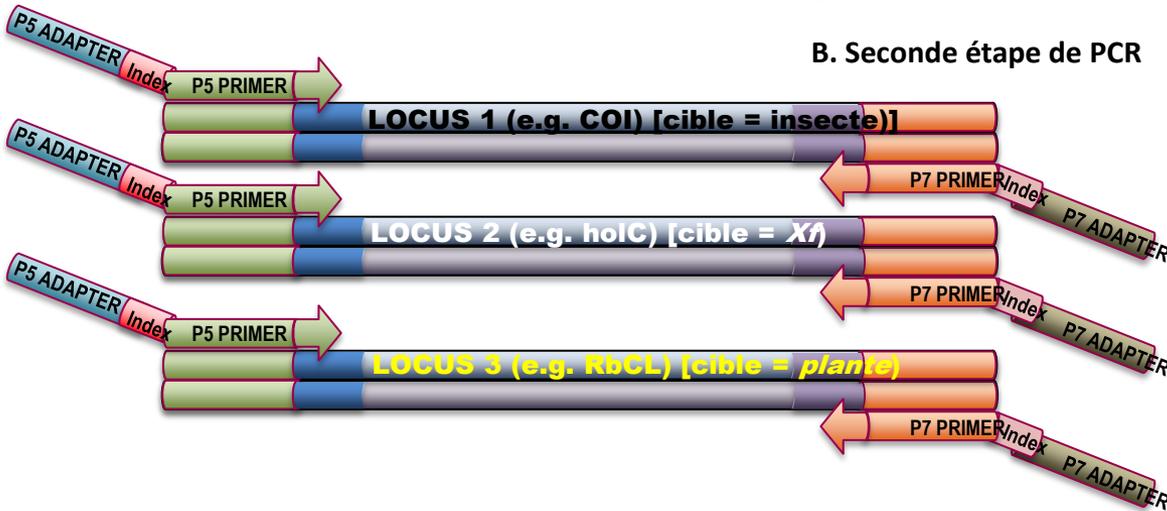
La PCR à deux étapes et ses possibilités

A. Première étape de PCR



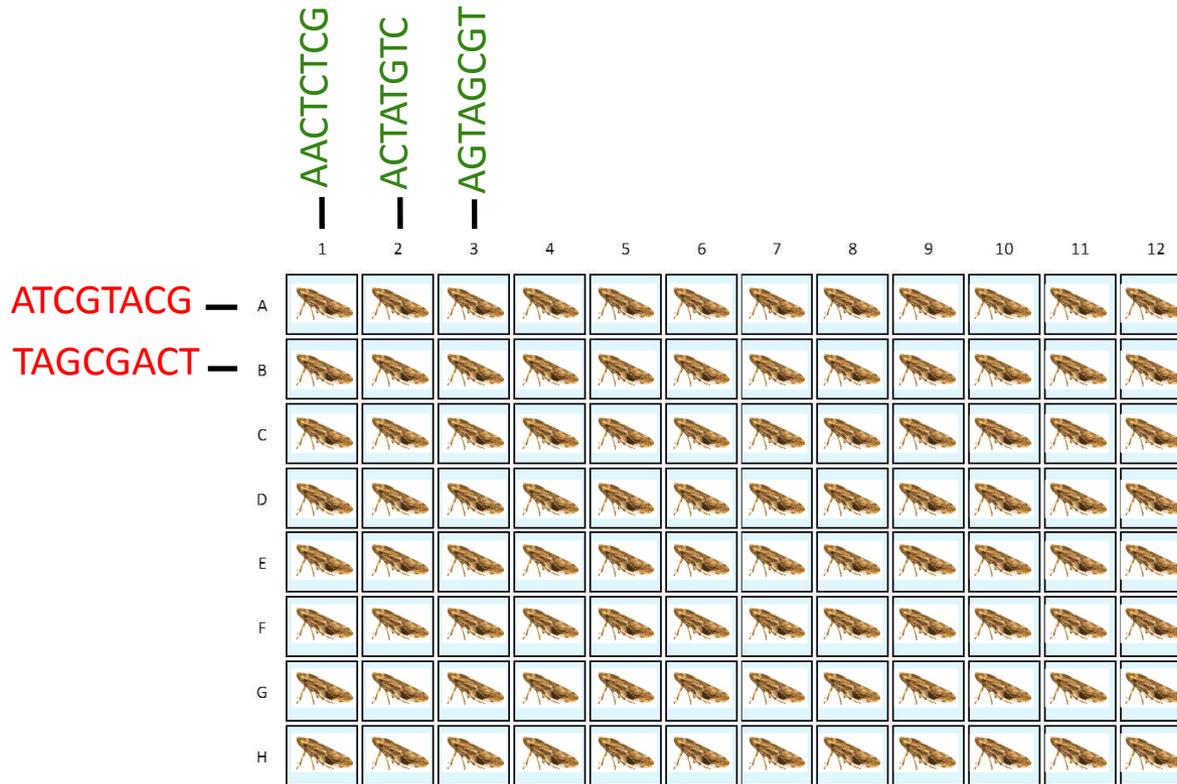
(A.) les loci d'intérêt sont amplifiés avec des amorces spécifiques qui possèdent une petite queue qui sert d'amorce (P5 primer) pour la seconde étape de PCR

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.

La PCR à deux étapes et ses possibilités



Chaque produit de PCR est marqué par une combinaison unique d'index
⇒ Les séquences pourront être attribuées à chaque insecte

Premiers résultats. Collaboration avec Rodrigo Krugner (USDA) (*)

Diverses espèces de vecteurs collectés en Corse été 2015

+

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

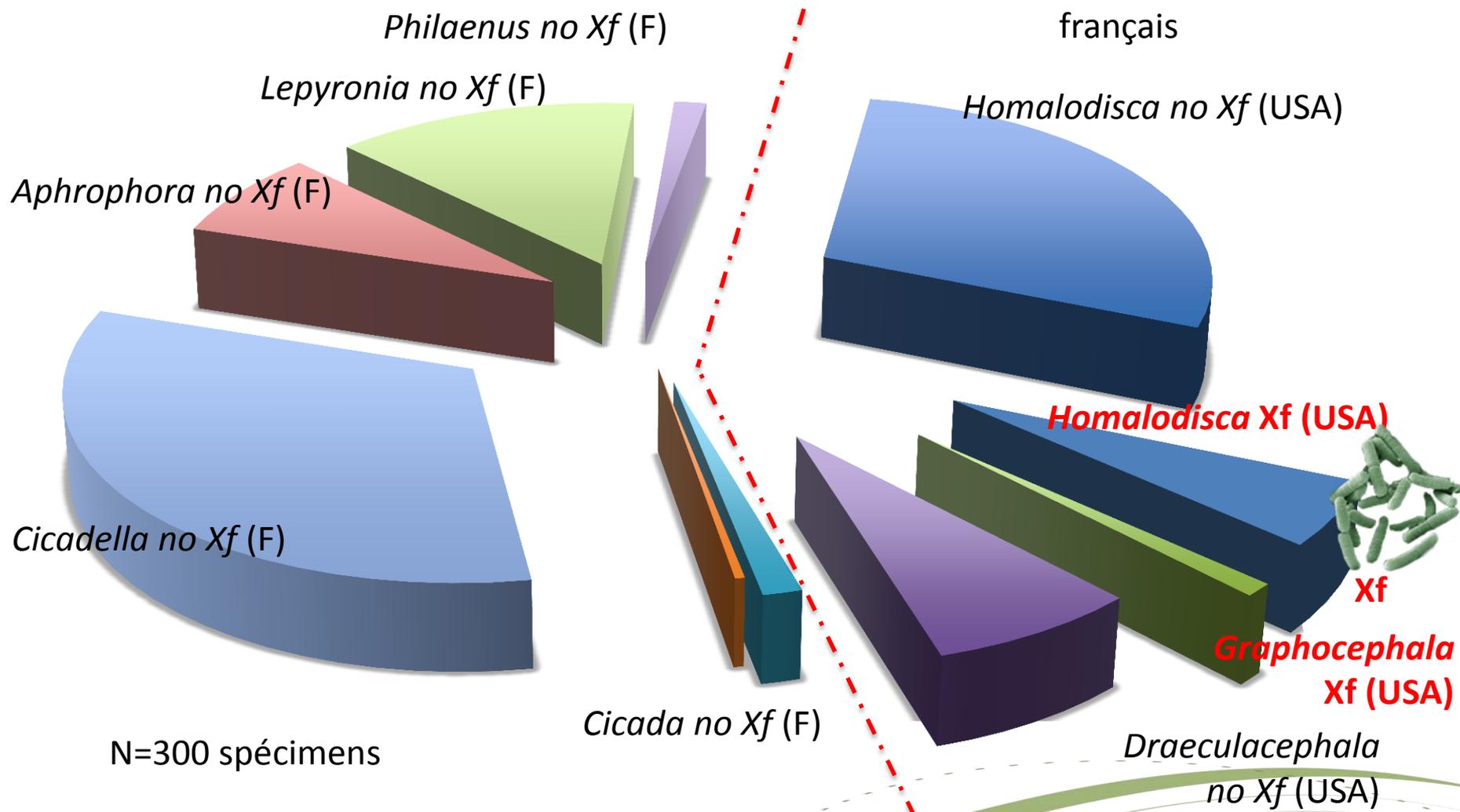
(*) Crop Diseases, Pests, and Genetics Research Unit
San Joaquin Valley Agricultural Sciences Center, CA, USA



Homalodisca vitripennis

Identification des individus porteurs de Xf

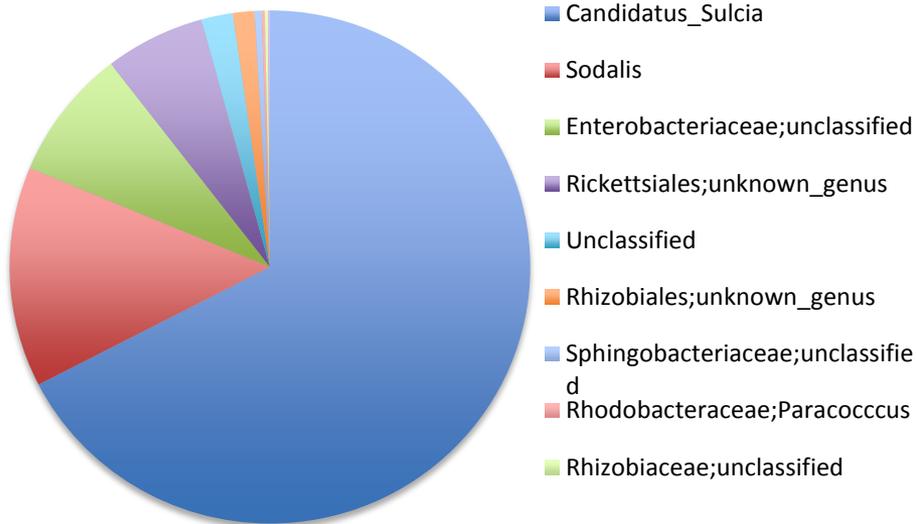
Mélange de vecteurs nord-américains et français



Identifier le microbiome

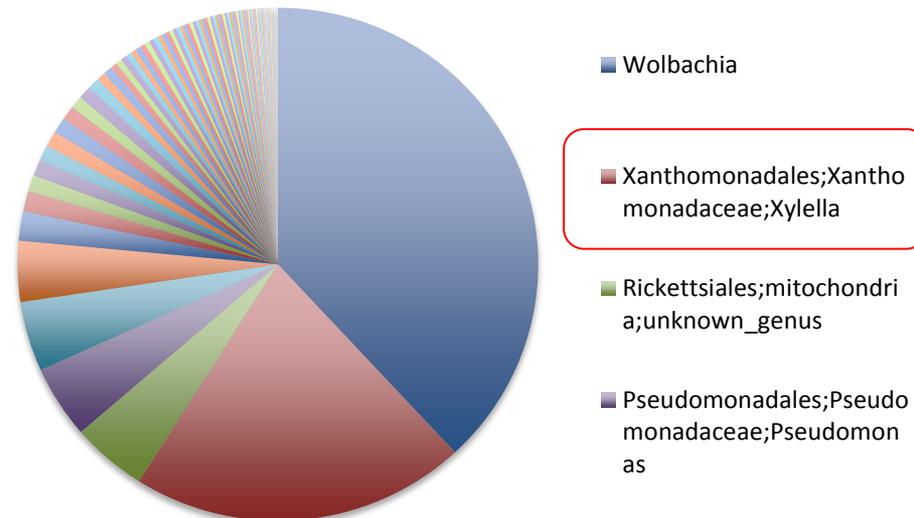
Rechercher d'éventuelles bactéries synergiques ou antagonistes, qui pourraient interagir avec *Xylella*

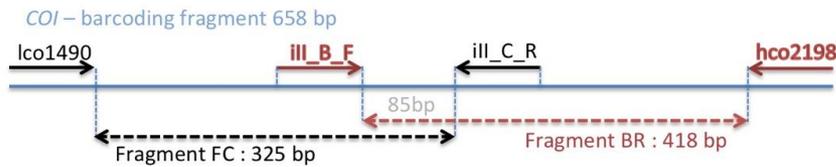
Microbiome d'un spécimen de *Philaenus spumarius*



N=300 spécimens

Microbiome d'un spécimen de *Homalodisca vitripennis*



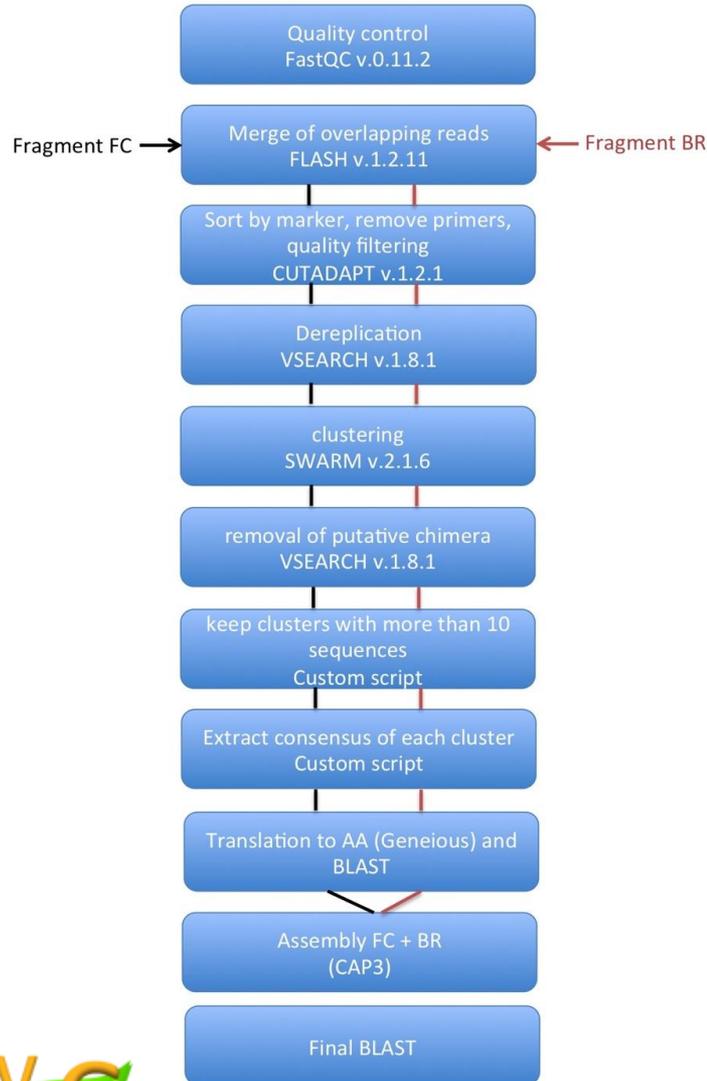


Développement du pipeline bioinformatique

Pipeline bioinformatique permettant de traiter nos données brutes de séquençage jusqu'à des séquences validées pour la mise en base de données.

Réalisé par P. et A. Cruaud Février 2016

- 18 millions de séquences
- Traitement des données en 48 – 72 heures
- Testé et validé à l'aide de séquences SANGER déjà réalisées
- Méthode innovante, en cours de publication

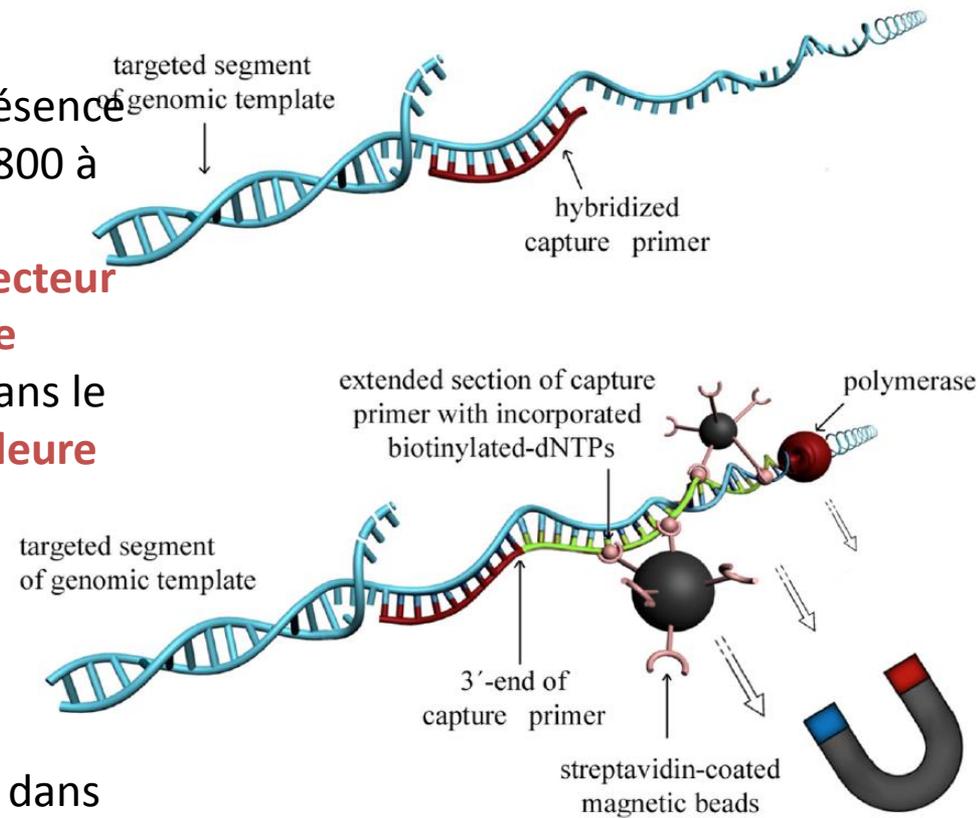


Conclusions

- 1) Développement d'un outil testant la présence de Xf, décrivant les microbiomes pour 800 à 1000 vecteurs
- 2) Identification des vecteurs (100%) => **vecteur est probablement une bonne sentinelle**
- 3) Permet des **approches quantitatives**, dans le temps, dans différents habitats => **meilleure description de paramètres, approche épidémiologique**

Faiblesses

- 1) Tester la méthode sur plantes => **tests**
Rechercher les seuils de détection de Xf dans l'insecte => **test différentes Q Xf**
- 2) Capturer les rares cellules de plantes ingérées => **passage capture ADN ciblé**
- 3) **Éliminer la PCR, évaluer la capture ciblée**
- 4) **Validation des résultats par des approches différentes (élevages, tests d'appétence)**



Capture de cibles géniques



Astrid Cruaud CR INRA
 Jean-Yves Rasplus DR INRA
 Jean-Pierre Rossi DR INRA
 Jean-Claude Streito IR INRA
 Sylvain Santoni IR INRA
 Stéphane Puissant Dijon

Gwenaëlle Genson TR INRA
 Eric Pierre AI INRA
 Sabine Nidelet TR INRA
 Anne-Alicia Gonzalez AI ICDD

Perrine Cruaud (Post-Doc*)
 Martin Godefroid (Post-Doc)



Merci pour votre attention !

Merci à nos soutiens financiers !



Merci à nos partenaires !

