

MISSION D'EXPERTISE SUR *XYLELLA FASTIDIOSA* EN CORSE

(3 au 11 août 2015)

Rapport définitif (31 août 2015)



MISSION D'EXPERTISE SUR

XYLELLA FASTIDIOSA EN CORSE (3 au 11 août 2015)

Rapport définitif (31 août 2015)

Gilbert Chauvel¹, Astrid Cruaud², Bruno Legendre³, Jean-François Germain⁴, Jean-Yves Rasplus²

¹ MAAF, DGAL, SDQPV, 251, rue de Vaugirard 75732 Paris Cedex 15

² INRA, CBGP, 755 avenue du campus Agropolis CS 30016 34988 Montferrier-sur-Lez

³ ANSES, LSV, Unité BVO, Equipe bactériologie, 7, rue Jean Dixmérás 49044 Angers Cedex 01

⁴ ANSES, LSV, 755 avenue du campus Agropolis CS 30016 34988 Montferrier-sur-Lez

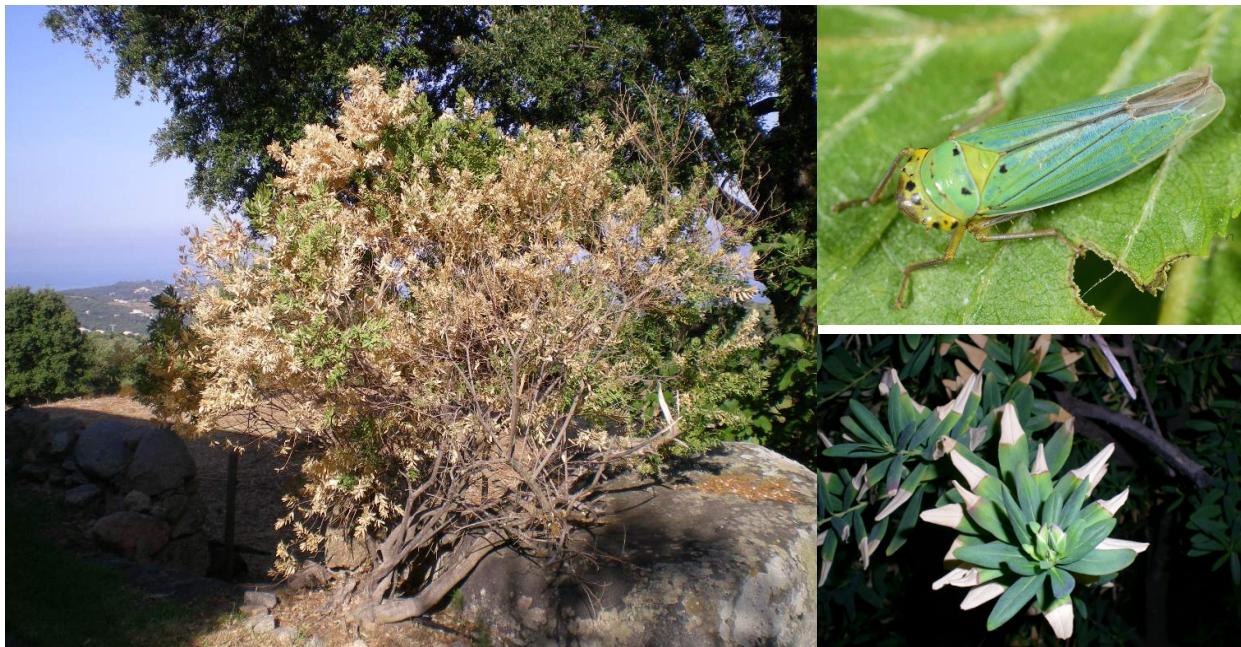


Table des matières

<u>REMERCIEMENTS</u>	7
<u>EXPERTS CONSULTES</u>	7
<u>RESUME DES CONCLUSIONS DE LA MISSION</u>	8
<u>RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR XYLELLA FASTIDIOSA</u>	14
ESPECE, SOUS-ESPECES, SOUCHES	14
SITUATION EN EUROPE	15
SYMPTOMES	16
NOTE SPECIFIQUE AUX CITRUS EN GENERAL ET CLEMENTINIERS EN PARTICULIER (SUITE AUX QUESTIONNEMENTS DES RESPONSABLES DE LA FILIERE EN CORSE)	16
<u>RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR LES VECTEURS DE XYLELLA FASTIDIOSA</u>	18
UNE MALADIE TRANSMISE PAR DES VECTEURS PIQUEURS-SUCEURS	18
DES VECTEURS EUROPEENS MECONNUS ET RESTANT A IDENTIFIER PRECISEMENT	19
BACTERIES, VECTEURS ET PLANTES-HOTES INFLUENCENT LA PREVALENCE DE LA MALADIE	20
<u>CONTEXTE CORSE ET LETTRE DE MISSION</u>	23
<u>OBJECTIF 1 - APPUI AUX SERVICES DE L'ETAT SUR PLACE DANS LE CADRE DE L'ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE SUR L'ORIGINE DU FOYER</u>	25
1.1. APPUI METHODOLOGIQUE AUX PRELEVEMENTS D'ECHANTILLONS ET A LA CAPTURE D'INSECTES VECTEURS	25
1.1.1. POUR LES ECHANTILLONS DE VEGETAUX A ANALYSER	25
1.1.2. POUR LA CAPTURE D'INSECTES VECTEURS	26
1.2. APPUI A L'ANALYSE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA SITUATION ET APPUI A L'INTERPRETATION DES DONNEES RECUEILLIES PAR LES SERVICES EN CHARGE DE PROTECTION DES VEGETAUX SUR LA DETERMINATION DE L'ORIGINE DU FOYER	28
1.2.1. PARAMETRES IMPORTANTS A DOCUMENTER SUR LES FOYERS	28
1.2.2. PARCELLES OU SITES TEMOINS	29
1.2.3. UTILISER LES SPECIFICITES DE LA CORSE COMME OBSERVATOIRE D'AGENTS PHYTOPATHOGENES MENAÇANT L'AGRICULTURE OU LA SYLVICULTURE NATIONALE, DANS UN CONTEXTE DE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE	29
1.3. PROPOSITIONS D'EXPLOITATIONS POSSIBLES DES DONNEES RECUEILLIES	32
1.4. RECOMMANDATIONS SUR LE FORMATAGE DES DONNEES RECUEILLIES EN VUE DE LEUR PARTAGE EVENTUEL DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE A VENIR, OU DE GROUPE DE TRAVAIL DE LA PLATE-FORME D'EPIDEMIO-SURVEILLANCE	33
<u>OBJECTIF 2 - ANALYSER LES INSECTES CONNUS POUR ETRE VECTEURS POUR IDENTIFIER S'ils SONT CONTAMINEES ET APTES A TRANSMETTRE LA BACTERIE</u>	35
2.1. AVANT-PROPOS	35
2.1.1. BILAN DES COLLECTES EFFECTUEES LORS DE LA MISSION	35
2.1.2. ETAT DE L'ART SUR LES METHODES MOLECULAIRES UTILISEES POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE XYLELLA FASTIDIOSA DANS DES INSECTES VECTEURS	36
2.1.3. INITIATION D'UNE COLLABORATION ANSES / INRA POUR LE DEVELOPPEMENT DES METHODES DE DIAGNOSTIC (IDENTIFICATION ET CARACTERISATION)	37
2.2. PRELEVEMENTS D'INSECTES SUSCEPTIBLES D'ETRE VECTEURS EN VUE DU DEVELOPPEMENT DE LA METHODE PAR L'ANSES PERMETTANT DE DETECTER LA BACTERIE SUR CES VECTEURS	37

2.3. PRELEVEMENTS D'INSECTES SUSCEPTIBLES D'ETRE VECTEURS EN VUE DU DEVELOPPEMENT PAR L'INRA D'UNE METHODE D'ANALYSE A HAUT DEBIT PERMETTANT DE TESTER LA PRESENCE DE LA BACTERIE SUR UN GRAND NOMBRE D'INSECTES	38
2.3.1. ANALYSE RAPIDE ET A MOINDRE COUT DES ECHANTILLONS COLLECTES EN CORSE	38
2.3.2. DEVELOPPEMENTS FUTURS PROPOSES POUR LA DETECTION A HAUT DEBIT DE X. FASTIDIOSA DANS LES INSECTES VECTEURS (NECESSITE LA MISE EN PLACE D'UN PROJET DE RECHERCHE – UN AN EST A PRIORI NECESSAIRE)	39
2.4. STOCKAGE APPROPRIE DES INDIVIDUS COLLECTES ET DES ADN EXTRAITS DE CES SPECIMENS, POUR DE FUTURES INVESTIGATIONS PAR LES EQUIPES ANSES ET INRA	41
2.5. INITIATION D'UN TRAVAIL SCIENTIFIQUE EN COMMUN (ANSES, INRA) SUR L'EVALUATION DE L'APTITUDE A LA TRANSMISSION DE LA BACTERIE PAR LES INSECTES VECTEURS PRELEVES EN ZONE DELIMITEE OU IDENTIFIES AU POINT 3/ ET EN FONCTION DU POINT PRECEDENT	42
<u>OBJECTIF 3 - ACQUERIR UNE MEILLEURE CONNAISSANCE DES VECTEURS POTENTIELS DANS LE CADRE DE RECHERCHES A MOYEN TERME</u>	<u>43</u>
3.1. TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE DE RECHERCHE DE POPULATIONS IMPORTANTES D'INSECTES VECTEURS POTENTIELS SUR PLANTES SPECIFIEES EN REGION CORSE QUI POURRAIENT ETRE SOURCE A L'AVENIR D'UN DEVELOPPEMENT EPIDEMIOLOGIQUE EXPONENTIEL	43
3.1.1. LES VECTEURS POTENTIELS EN CORSE, QUI SONT-ILS ; QUEL EST NOTRE NIVEAU DE CONNAISSANCE SUR CHACUN D'ENTRE EUX ?	43
3.1.2. LES VECTEURS POTENTIELS DE X. FASTIDIOSA PRESENTS EN CORSE : ASPECT GENERAL, OU LES TROUVER ?	44
3.1.3. DE L'INTERET D'UNE BASE DE DONNEES INTERFACEES WEB CONTENANT DES INFORMATIONS SUR CHAQUE ESPECES AINSI QUE DES BARCODES POUR LEUR IDENTIFICATION MOLECULAIRE	44
3.2. IDENTIFICATION DES RESEAUX D'INTERACTIONS POTENTIELLES ENTRE PLANTES HOTES DE LA MALADIE ET VECTEURS POTENTIELS	46
3.3. AVIS SUR LA MISE EN PLACE D'UNE SURVEILLANCE EXHAUSTIVE EN CORSE, VOIRE EN FRANCE, DU GROUPE CIGALES, CICADELLES, CERCOPES ET APHROPHORES. RECOMMANDATIONS ET PROPOSITIONS DE MISE EN OEUVRE POUR UN TEL DISPOSITIF (COLLECTES D'INSECTES A REALISER A GRANDE ECHELLE ET DANS LA DUREE, PAR DIFFERENTES METHODES).	50
3.3.1. INTERETS D'UNE SURVEILLANCE SUR L'ENSEMBLE DU TERRITOIRE DE CES ORGANISMES DANS LE CADRE DU DISPOSITIF GENERAL D'EPIDEMIO-SURVEILLANCE :	50
3.3.2. PROPOSITIONS DE DISPOSITIF	51
<u>OBJECTIF 4 - DETERMINER, AU REGARD DE LA SITUATION LOCALE, S'IL EST PERTINENT DE PRENDRE EN COMPTE CERTAINS FACTEURS DE RISQUES SPECIFIQUES EN VUE DE PREVENIR LA DIFFUSION DE LA MALADIE</u>	<u>56</u>
4.1. INITIATION D'UNE ANALYSE DE RISQUES LIES AUX PRINCIPAUX FLUX DE VEGETAUX DE LA CORSE, VERS LA FRANCE METROPOLITAINE OU AUTRES PAYS, ET DES RISQUES QUI POURRAIENT Y ETRE ASSOCIES	56
4.1.1. PRINCIPALES PRODUCTIONS CORSES SENSIBLES A XYLELLA FASTIDIOSA ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE.	56
4.1.2. FLUX DE LA CORSE VERS LA METROPOLE ET AUTRES PAYS UE OU TIERS	59
4.2. EBAUCHE D'UNE ANALYSE DU RISQUE LIE A LA PRESENCE DE POLYGALA NATURELS ET SUBSPONTANES ET A LA COMMERCIALISATION DE POLYGALA MYRTIFOLIA ET DE SES HYBRIDES HORTICOLES (MODES DE PRODUCTION, FLUX...)	69
4.2.1. PRESENTATION DE LA PLANTE ET DE LA CULTURE DE POLYGALA EN CORSE	69
4.2.2. ANALYSE DES SITUATIONS D'INFESTATION DES POLYGALES EN CORSE	72
4.2.3. HYPOTHESES ET OPINIONS SUR LES INFESTATIONS DE POLYGALES EN CORSE	83
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	<u>87</u>
<u>REFERENCES CITEES</u>	<u>88</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>93</u>
ANNEXE 1. ETAT DE L'ART SUR LES METHODES MOLECULAIRES UTILISEES POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE X. FASTIDIOSA DANS DES INSECTES VECTEURS	93
ANNEXE 2 : LISTE DES VECTEURS POTENTIELS DE XYLELLA FASTIDIOSA EN EUROPE	100

ANNEXE 3 : LETTRE DE MISSION	104
ANNEXE 4 : CALENDRIER DE LA MISSION	106
ANNEXE 5. METHODES RECOMMANDÉES POUR L'ECHANTILLONNAGE D'INSECTES VECTEURS POTENTIELS DE X. FASTIDIOSA	109
ANNEXE 6. RECOMMANDATIONS POUR LA CONSERVATION DES INSECTES EN VUE DE LEUR IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE, DE L'AMPLIFICATION PCR ET DU SEQUENÇAGE DE LEUR ADN (ET EVENTUELLEMENT DE CELUI DE XYLELLA spp.)	115
ANNEXE 7. PROPOSITIONS D'EXPLOITATIONS POSSIBLES DES DONNEES RECUEILLIES. PREMIERS RESULTATS SUR L'ANALYSE DE LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE POTENTIELLE DE XYLELLA FASTIDIOSA SUBSP. MULTIPLEX EN FRANCE.	117
ANNEXE 8. RESULTATS DE L'ECHANTILLONNAGE D'INSECTES REALISE PENDANT LA MISSION (VECTEURS POTENTIELS SURLIGNES EN JAUNE)	124
ANNEXE 9 : RECOMMANDATIONS SUR LES BESOINS EN TERME DE RECHERCHE EN VUE DU DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS NECESSAIRES A LA LUTTE CONTRE X. FASTIDIOSA	125
ANNEXE 10. METHODE A HAUT DEBIT POUR LA DETECTION ET LA CARACTERISATION DE XYLELLA spp. DANS DES INSECTES VECTEURS.	127
ANNEXE 11. FICHES DE PRÉSENTATION DES ESPÈCES DE VECTEURS POTENTIEL PRÉSENTES EN CORSE.	130
ANNEXE 12. ESPÈCES DE POLYGALA RENCONTREES EN CORSE	136
ANNEXE 13 : ÉVALUATION DU LABORATOIRE DE L'UNIVERSITÉ DE CORTE SUR SON APTITUDE A REPONDRE AUX CRITERES D'UN LABORATOIRE AGREE POUR LA REALISATION DES ANALYSES DE DETECTION DE X. FASTIDIOSA (VISITE DU MERCREDI 05 AOUT 2015)	138

Remerciements

Nous remercions chaleureusement les directions de la DGAL (Patrice Dehaumont, Emmanuelle Soubeyran, Alain Tridon, Joël Francart et Juliette Auricoste), de l'ANSES (Marc Mortureux), et de l'INRA (François Houllier, Olivier Le Gall et Christian Lannou), la Préfecture de Corse (Christophe Mirmand, David Myard), la Draaf Corse (Sylvie Malézieux, Agnès Poirier), la BNEVP (Catherine Collinet, Maurice Boureau), les Conseils départementaux de la Corse du Sud et de la Haute Corse, la Fredon Corse (Michaël Lecat), et l'ensemble des personnes qui nous ont accueillis : l'Université de Corte (Anne Luciani), le centre Inra de Corse (François Casabianca), le CNBC (Laetitia Hugot) et les citoyens, particuliers ou professionnels, avec qui nous avons échangé ou qui nous ont donné accès à leur propriété afin que nous puissions y échantillonner de possibles vecteurs et observer *in situ* les foyers infectieux.

Experts consultés

Ce rapport a bénéficié des apports et/ou relectures éclairés de :

Bertrand Bourgouin, DGAL, Toulouse.

François Casabianca, INRA, Centre de Corte.

Thierry Candresse, INRA, BFP, Bordeaux.

Jean-Luc Flot, DGAL, DSF, Paris.

Guillaume Girard, DRAAF-SRAL Midi Pyrénées, Toulouse.

Laetitia Hugot, CNBC, Corte.

Marie-Agnès Jacques, INRA, IRHS, Angers.

Jacques Grosman, DGAL, Lyon.

Jérôme Jullien, DGAL, Angers.

Jean-Pierre Rossi, INRA, CBGP, Montferrier-sur-Lez.

Samuel Soubeyrand, INRA, BioSp, Avignon.

Résumé des conclusions de la mission

Avant-propos : les conclusions de ce rapport sont basées sur les éléments de la situation corse portés à notre connaissance au 26 août 2015. A savoir, i) 56 foyers de *Xylella fastidiosa* sous-espèce *multiplex* sur *Polygala myrtifolia* dont 1 foyer abritait également 5 pieds de *Spartium junceum* (faux genêt d'Espagne) positifs pour *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* ; ii) tests négatifs pour la présence de la bactérie sur tous les végétaux collectés par les services de l'Etat à proximité des foyers ; iii) tests négatifs pour tout le continent, quelle que soit l'espèce de plante (hormis des interceptions sur caféiers). Des analyses sont encore en cours. **Si de nouveaux éléments devaient apparaître dans les semaines / mois suivant la restitution de ce rapport, certaines de nos conclusions devraient être revues.**

Il apparaît que des efforts de recherche sont nécessaires afin de lutter contre la bactérie et de prévenir l'entrée d'autres sous-espèces / souches sur le territoire français. Quelques pistes sont livrées tout au long du texte et résumées en [annexe 9](#). Ces recherches pourraient bénéficier de manière générale à la surveillance du territoire, au suivi épidémiologique en santé des plantes et à la prédiction des risques. Le plan du présent rapport est calqué sur les objectifs fixés par la lettre de mission [annexe 3](#).

En réponse à la demande de la lettre de mission, le résultat de l'évaluation du laboratoire de Corte concernant son « aptitude à répondre aux critères d'un laboratoire agréé pour les analyses *Xylella* » est placé en [annexe 13](#).

Rappels des connaissances sur *Xylella fastidiosa*

- Un bref rappel est proposé
- Eu égard aux interrogations des agents de l'Etat et des responsables de filières que nous avons rencontrés, il semble pertinent d'initier la construction d'un site web (en français), présentant la bactérie et insistant sur les différences entre espèce, sous-espèce et souche. Le site web pourrait contenir, pour chaque sous-espèce de *Xylella fastidiosa*, sa répartition géographique et la liste des plantes hôtes, avec des références bibliographiques explicites afin de dissiper toute question / incompréhension. Nous avons connaissance qu'une telle recherche bibliographique a été initiée à la demande de l'EU mais aucune base publique interrogeable sur internet ne semble en ligne à ce jour. Les listes pourraient être complétées au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, tout en étant validées par un comité d'experts.
- Il semble également important de faire une phylogénie globale de toutes les séquences disponibles sur la base de référence PubMLST pour toutes les sous-espèces/souches de *Xylella fastidiosa* (et de la compléter en temps réel) afin de tester des hypothèses de conservatisme de niche (e.g. spécificité d'hôte de certaines lignées) pour améliorer les prédictions du risque associé à l'arrivée d'une souche avec un profil allélique donné.
- Eu égard aux interrogations des responsables de filières que nous avons pu rencontrer; à notre connaissance, la sous-espèce *multiplex* qui a été trouvée en Corse n'a jamais été rapportée sur *Citrus*. Cette souche ne semble pas attaquer les espèces de *Citrus*. Aucun travail scientifique n'a démontré une telle pathogénicité. L'information de la

contamination de *Citrus* par *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, diffusée sur plusieurs documents (notamment le rapport de l'EFSA (2015) est due à une erreur d'interprétation d'une citation bibliographique.

Rappels des connaissances sur les vecteurs de *Xylella fastidiosa*

- Les vecteurs potentiels européens de *Xylella* restent à découvrir, et leur biologie est très mal connue (en particulier leurs plantes d'alimentation et les plantes-hôtes). Des études biologiques doivent être menées urgentement. Une liste des vecteurs potentiels de *X. fastidiosa* en Europe est présentée en [annexe 2](#)
- L'épidémiologie de la maladie dans un contexte méditerranéen n'a jamais été décrite de manière argumentée. Peu de travaux (pour ne pas dire aucun) ont analysé l'importance relative des différents facteurs prédisant la capacité de transmission de *X. fastidiosa* par différents vecteurs, à différentes périodes et en fonction de différents paramètres. Il est important d'acquérir des données permettant de mieux connaître les interactions plantes ⇔ *Xylella* ⇔ vecteurs.

Objectif 1 - Appui aux services de l'Etat sur place dans le cadre de l'enquête épidémiologique sur l'origine du foyer

- Plusieurs réunions visant à un transfert des connaissances ont été organisées avec les services de l'Etat présents en Corse, des prélèvements ont été effectués en présence des missionnaires et des agents locaux ([annexe 4](#))
- L'ordre de service d'action / Instruction technique DGAL/SDQPV/2015-449 du 13/05/2015 l'objet est le plan de surveillance *Xylella fastidiosa*, doit être réactualisé et prendre en compte la situation actuelle en Corse.
- La constitution de pool d'échantillons, actuellement pratiquée ponctuellement, est à proscrire (un échantillon = un individu végétal).
- Des détails sur les méthodes de piégeage recommandées pour la capture des vecteurs potentiels de *Xylella fastidiosa* sont fournis en [annexe 5](#)
- Des méthodes simples et peu coûteuses pourraient être utilisées en combinaison afin de recenser les espèces de vecteurs potentiels présentes en Corse (fauchage / battage + pièges à glu – chasse à vue pour les cigales) et suivre le taux d'infection des populations. Le plus coûteux est l'investissement humain (temps de chasse et temps de tri des échantillons récoltés)
- Un protocole pour le stockage des insectes récoltés est fourni en [annexe 6](#). Le recensement précis des informations de collecte y est recommandé
- L'utilisation de pièges à glu pour la capture d'insectes à des fins de détection moléculaire de *Xylella* spp semble prometteuse mais devra être validée. Elle nécessitera le développement d'une base de données de barcodes pour permettre l'identification des insectes sans nécessité de s'appuyer sur des critères morphologiques.
- Les données de surveillance d'une récolte doivent comprendre : 1) Un numéro unique de foyer et de collecte ; 2) les coordonnées géographiques ; 3) La date et le nom du récolteur ; 4) Le nom de la plante-hôte ; 5) une liste de plantes (dans un rayon de 50m) ; une typologie de la densité des plantes montrant des symptômes. ; une collecte des insectes vecteurs par fauchage.

- Il est important de mettre en relation le nombre de cas positifs avec une estimation de l'effort de surveillance (temps passé à chercher des plantes positives)
- Il est recommandé de rapidement identifier des parcelles témoins dans des habitats représentatifs de la diversité des agro-écosystèmes corses, afin de suivre une éventuelle épidémie.
- Il semble important de mieux utiliser les spécificités de la Corse comme observatoire d'agents phytopathogènes menaçant l'agriculture ou la sylviculture nationale, et ceci dans un contexte de réchauffement climatique.
- L'exploitation des données se fera à trois niveaux emboités répondant à des questionnements présents ou futurs différents : 1) niveau local (parcelles) pour mieux comprendre la diffusion de la maladie ; niveau intermédiaire (région, ensemble de sites ateliers) pour analyser la dynamique inter-localités ; 3) le niveau national (européen) pour prévoir des zones à risque (voir [Annexe 7](#)).
- Les données produites par les services de l'Etat pourrait servir rapidement à : 1) Modéliser la progression spatiotemporelle de la maladie, 2) prédire une expansion future et les zones à risque sur le continent, 3) Optimiser les plans de surveillance, en réduisant le nombre des zones à surveiller, 4) faire une description des communautés d'insectes vecteurs efficaces en Corse, 5) Alimenter une bibliothèque de code-barres génétiques pour identifier les vecteurs.
- Le moyen le plus efficace pour le stockage et le partage des données recueillies serait probablement de développer une base de données sécurisée, accessible via internet.

Objectif 2 - Analyser les insectes connus pour être vecteurs pour identifier s'ils sont contaminées et aptes à transmettre la bactérie

- Sur les 11 espèces potentiellement vectrices de *X. fastidiosa*, identifiées comme présentes en Corse, six ont été récoltées lors de la mission (soit 1142 insectes sur les 1726 prélevés, [annexe 8](#)). On note qu'*Aphrophora pectoralis*, à notre connaissance non encore signalé de Corse, a été récolté pendant la mission.
- Des collectes futures seront nécessaires afin d'avoir une meilleure idée des vecteurs possiblement porteurs de la bactérie (notamment *Philaenus spumarius*, en estivation durant la mission).
- Un état de l'art des méthodes de détection de *X. fastidiosa* dans les insectes hôtes et de caractérisation de la souche est présenté en [annexe 1](#).
- L'ANSES et l'INRA proposent de travailler de concert afin de mettre en place des outils pertinents et opérationnels rapidement pour la détection de *X. fastidiosa* dans les insectes vecteurs (des pistes de recherche sont proposées).
- Ces protocoles devront être testés et validés, un effort de recherche à court terme est nécessaire (1an) mais des méthodes à haut-débit ([annexe 10](#)), qui pourraient s'appliquer sur plantes et insectes, devraient permettre d'améliorer la surveillance du territoire et de suivre une possible épidémie.
- On rappelle que ce n'est pas parce que *Xylella fastidiosa* est détectée dans le (pré)cibarium de l'insecte que celui-ci sera un vecteur efficace pour une plante donnée, des tests de vection sont nécessaires

- Ces tests devront être réalisés dans des installations présentant un très haut niveau de confinement type NS3 et nécessiteront un effort de recherche à moyen terme

Objectif 3 - Acquérir une meilleure connaissance des vecteurs potentiels dans le cadre de recherches à moyen terme

- La biologie (en particulier les spectres d'hôte) des 11 espèces potentiellement vectrices en Corse est mal connue. Des travaux de recherche sont nécessaires pour améliorer nos connaissances
- Il est donc difficile de hiérarchiser les conséquences épidémiologiques du développement des populations de ces vecteurs potentiels
- L'identification des vecteurs nécessite des connaissances poussées en entomologie.
- Tout en encourageant la production de fiches d'identification plus complètes, on propose des fiches de présentation rapide des espèces en [annexe 11](#) (seule production restituée dans un si court laps de temps)
- Un site web adossé à une base de données moléculaires construite sur des connaissances entomologiques solides et permettant l'identification des espèces à partir de leur séquence ADN serait profitable. Les données sur la biologie/répartition des espèces pourraient y être renseignées au fur et à mesure de l'avancée des connaissances
- Il n'est pas impossible que certaines espèces soient des complexes avec des entités présentant des spectres d'hôtes plus réduits et des capacités de vécion différente (e.g. *Philaenus spumarius*), ce qui souligne la nécessité de développer des recherches sur ces espèces.
- Nous recommandons que les espèces non présentes en Europe mais présentant des risques importants quant à la transmission de *Xylella fastidiosa* (e.g. *Homalodisca vitripennis*) soient clairement intégrées à la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire
- Il est obligatoire de mettre en place, le plus rapidement possible, des études de biologie sur vecteurs (plantes-hôtes, plantes d'alimentation, cycle, dispersion, ennemis naturels) et sur les plantes pouvant servir de réservoir pour la bactérie.
- Il serait pertinent de commencer rapidement des tests en condition confinée pour vérifier la capacité de transmission des vecteurs potentiels en Corse et pour mieux connaître les plantes pouvant héberger la bactérie.
- La répartition des vecteurs étant très peu connue, il y a un intérêt à mettre une surveillance généralisée en place et à tracer la présence et répartition de ces espèces.
- Seules quelques-unes des 52 espèces répertoriées comme présentes en France ont une importance agronomique.
- Aucune cigale n'est retenue mais la transmission de *X. fastidiosa* ssp *pauca* par des cigales a été démontrée expérimentalement sur cafetier au Brésil et sur vigne en Californie. Etant donné les populations importantes de cigales et leur large spectre d'hôte, leur implication mériterait d'être éclaircie en Europe.
- Un dispositif est proposé pour réaliser un inventaire et un suivi des espèces d'insectes potentiellement vectrices de la bactérie, de mieux connaître leur biologie et leur phénologie, et de contrôler leur état d'infectiosité sur l'ensemble du territoire.

- La mise en place de ce dispositif nécessite la construction d'un réseau qui pourrait opportunément s'intégrer aux réseaux d'épidémi-o-surveillance de la DGAL préexistants comme les réseaux SBT, du DSF, des différents plans de contrôle, etc.
- De nombreux acteurs pourraient être impliqués : des structures institutionnelles, des instituts techniques, les organisations professionnelles, chambres d'agriculture, voire les services d'entretien des espaces verts de collectivités territoriales.
- Le dispositif précise les techniques de piégeages qui pourraient être utilisées, les cultures et filières concernées, la répartition des piégeages et leur positionnement. Ce dispositif mérite néanmoins d'être discuté.

Objectif 4 - Acquérir une meilleure connaissance des vecteurs potentiels dans le cadre de recherches à moyen terme

- L'importance surfacique et économique des principales productions sensibles à *Xylella fastidiosa* en Corse est précisée.
- Une analyse sur la possibilité de contamination par *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* des *Citrus* en général et des clémentines en particulier est proposée. Il en ressort que les deux souches de *X.f.* subsp. *multiplex* présentes en Corse n'attaquent apparemment pas les citrus. Les risques quant au commerce de clémentines accompagnées de feuilles demeurent donc quasi nuls en l'état actuel des connaissances. Les conditions de commercialisation telles que pratiquées peuvent perdurer sans changement.
- La commercialisation de citrus en provenance de Corse et destiné à la métropole ou autres pays de l'U.E. doit pouvoir se poursuivre sans aucun risque de contamination par les souches de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* détectées en Corse, moyennant le respect des réglementations européennes et françaises en vigueur régissant la délivrance du passeport phytosanitaire européen.
- L'hypothèse d'une contamination de *Polygala myrtifolia* par les polygales naturels qui auraient pu être préalablement infectés, semble invraisemblable. Sous réserve de la confirmation de leur bon état sanitaire attesté par des analyses d'échantillons de plantes asymptomatiques.
- Nous n'avons aucune donnée sur d'éventuels niveaux de sensibilité à *X.f.* subsp. *multiplex* des espèces naturelles et cultivars, il est donc important de réaliser une surveillance de ces espèces (en particulier celles de plaines).
- Bien que subsistent des incertitudes sur les causes ultimes du plant de genêt contaminé (on ne peut pas définitivement exclure l'action de vecteurs), nous émettons l'hypothèse qu'une transmission et contamination des polygales au genêt planté en 2007 aient pu se produire à la faveur d'une opération de taille de formation des plants par des outils non désinfectés, et que la contamination des pieds fils issus de semences s'est produite par anastomoses racinaires.
- La spécificité des attaques actuellement observées sur polygales, les conditions de production des jeunes plants en toute absence de garantie sanitaire nous incitent à privilégier un processus de contamination verticale pour la filière *Polygala* en particulier, mais l'action des vecteurs nécessite d'être scientifiquement écartée.
- Des études sont nécessaires pour parfaire les inventaires d'espèces de vecteurs potentiels en Corse, pour connaître leur éventuel état d'infectiosité, leur répartition géographique,

sur les possibilités de contamination de *X.f.* subsp. *multiplex* sur les autres espèces végétales hôtes en Corse et ce qui pourrait expliquer une compétence particulièrement efficace pour la transmission de *X.f.* subsp. *multiplex* sur polygales.

- Il est important de maintenir le suivi des espèces végétales connues pour être sensibles à *X.f.* subsp. *multiplex* (en particulier aux souches Dixon et Griffin-1) et de multiplier les prélèvements afin de s'assurer que les contaminations n'existent pas.
- Le suivi est conseillé en particulier dans les zones de plaines présentant un climat favorable au développement de la bactéries.
- L'enquête de la BNEVP met en évidence une grande fragilité du système européen de production de plants vis-à-vis de la maîtrise du risque *Xylella* sur polygale.
- L'instauration de la délivrance du passeport phytosanitaire européen pour la commercialisation des polygales est indispensable, de même que l'écriture et l'incitation à mettre en œuvre un règlement technique de certification sanitaire des pieds mères et plants de polygale multipliés végétativement.
- Les grands distributeurs de plants doivent être incités à se doter d'un code de bonne conduite pour exiger de leurs fournisseurs des garanties sanitaires, d'un plan de maîtrise adapté à leur activité de distributeur, et d'un plan de communication destiné à leur client.
- Empêcher toute multiplication de polygales en corse en dehors de toute mesure de certification des plants, et Evaluer les conséquences sanitaires, économiques et environnementales d'une hypothèse d'interdiction de commercialisation et de plantation des polygales.
- La situation de contamination spécifique des polygales en Corse, si elle se confirme dans le temps, pourrait justifier de l'application de mesures proportionnées au risque, tant pour la gestion des foyers, que pour les mesures prises en zones délimitées
- Le catalogue officiel des usages nécessite la création d'un usage insecticide Cicadelles, Cercopes*Traitements des Parties aériennes, pour l'ensemble des cultures hôtes potentielles de *Xylella fastidiosa*, actuellement orphelines de cet usage.
- L'épidémio-surveillance des insectes vecteurs potentiels de *X.f.* doit être intégrée dans les meilleurs délais dans le réseau national d'épidémio-surveillance afin de générer des données indispensables à la recherche épidémiologique de la bactérie, et d'affiner les mesures de gestion tant préventives que curatives le cas échéant.
- Des campagnes d'information à destination notamment des touristes et portant sur les risques de propagation et la dangerosité de *X.f.* pourraient être renforcées et systématisées à tous les lieux et modes de passage entre Corse et continent.
- Des campagnes de communication adaptées aux filières de productions agricoles, horticoles, forestières, ainsi qu'aux zones non agricoles professionnelle et amateur, pourraient être mises en place par les instituts techniques et associations représentatifs de ces filières

Rappels des connaissances sur *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa (Xanthomonadaceae) est une **bactérie du xylème, disséminée par des insectes vecteurs (Retchless et al., 2014)**. La maladie qui lui est associée a été décrite pour la première fois sur vigne en Californie en 1887 par le phytopathologue Newton B. Pierce. Environ 14 000 ha de vignobles californiens ont été détruits dans les années 1880. La bactérie a été isolée sur milieu de culture pour la première fois en 1978 (Davis et al., 1978). En 1987, *Xylella fastidiosa* a été officiellement décrite en tant que bactérie du xylème, gram-négative (Wells et al., 1987). En 1987, la chlorose panachée des *Citrus* (Citrus Variegated Chlorosis – CVC) a été décrite au Brésil dans l'état de São Paulo en relation avec *X. fastidiosa*, pour s'étendre ensuite de façon exponentielle, dans les années qui suivirent, à la quasi-totalité du verger d'orangers (*Citrus sinensis*) brésilien. **La bactérie est maintenant signalée de l'Argentine à l'Ontario (Canada)**. La sous-espèce *X.f. subsp. fastidiosa*, responsable de la maladie de Pierce sur vigne a été signalée à Taiwan en 2013 (Su et al., 2013), l'île abrite également ce qui semble être une espèce proche de *X. fastidiosa* et qui provoque des brûlures foliaires sur nashi (*Pyrus pyrifolia*).

Espèce, sous-espèces, souches

Plusieurs sous-espèces de *Xylella fastidiosa* ont été décrites, avec des spectres d'hôtes larges mais différents. Ainsi, il est important de rappeler que si l'espèce *Xylella fastidiosa*, prise dans son ensemble, peut infecter plus de 300 espèces végétales appartenant à plus de 60 familles botaniques (EFSA), les sous-espèces et souches (lignées génétiques) ont des spectres plus réduits et représentent donc des degrés différents de menace vis-à-vis d'une culture donnée, comme résumé ci-dessous :

- *X. f. subsp. fastidiosa*, responsable de la maladie de Pierce sur vigne, mais également présente sur cafiers et de très nombreuses autres plantes, 42 familles sont ainsi listées dans le rapport de l'EFSA (2015) ;
- *X. f. subsp. multiplex*, présente entre autre sur *Prunus* sp., *Quercus* sp., olivier, érable, orme, platane, micocoulier etc... avec des lignées différenciées qui pourraient s'attaquer préférentiellement à certains hôtes selon certaines études (Nunney et al., 2013) mais pour lesquelles des travaux supplémentaires sont nécessaires ;
- *X. f. subsp. sandyi*, présente sur laurier rose et cafiers ;
- *X. f. subsp. pauca*, présente sur citrus dont oranger, cafiers et oliviers, avec pour chacun de ces hôtes des souches différenciées ;
- *X. f. subsp. morus*, présente sur mûrier (*Morus* sp.) ;
- *X. f. subsp. tashke*, présente sur *Chitalpa tashkentensis*.

Seules *X. f. subsp. fastidiosa* et *X. f. subsp. multiplex* sont à ce jour officiellement décrites dans la *List of new names of plant pathogenic bacteria* (Bull et al., 2014).

Jusqu'à récemment, il était difficile d'identifier moléculairement la lignée (souche) au sein de la sous-espèce portée par une plante donnée (limites techniques). En conséquence **les listes des plantes hôtes de certaines souches restent à préciser**. En particulier il semble que des entités génétiques distinctes ayant des spectres d'hôtes relativement restreints soient présentes au sein de certaines sous-espèces, notamment *multiplex* (Nunney et al., 2013). D'un autre côté, il est également difficile de détecter la bactérie dans certaines plantes, du fait, par exemple de la présence d'inhibiteurs de PCRs tels que les tanins ou parce que l'accumulation de la bactérie dans les tissus peut être hétérogène (Hopkins, 1985). Enfin, **plusieurs espèces de plantes sont asymptomatiques** (Retchless et al., 2014). Tous ces éléments compliquent la description des gammes d'hôtes.

Vérifier les listes établies, compiler en temps réel en fonction de l'avancée des connaissances et rendre publique la liste exhaustive des plantes hôtes de chaque sous-espèce (voire souche) de *X. fastidiosa* est un travail en soi, en dehors du scope de ce rapport, mais qu'il serait pertinent d'initier au vu des questions qui nous ont été posées lors des entretiens que nous avons eus avec les personnels des services de l'Etat ou responsables de filières. Une telle recherche bibliographique semble avoir été initiée à la demande de l'EU mais aucune base publique interrogeable sur internet ne semble en ligne à ce jour (Czwienczek et al., 2014).

Situation en Europe

***X. fastidiosa* a été détectée fin 2013 dans la région des Pouilles en Italie du Sud sur oliviers** (Loconsole et al., 2014) La superficie de la zone contaminée, estimée à 8 000 ha à l'époque, s'avère être aujourd'hui de plus de 200 000 ha. **La souche de *Xylella fastidiosa* isolée en Italie, a été identifiée comme appartenant à la sous-espèce *pauca* (souche CoDIRO,** (Giampetrucci et al., 2015)), taxonomiquement proche d'une souche costaricaine présente sur laurier-rose et caféier. En Italie, la bactérie est également présente, et pathogène, sur amandier, cerisier ainsi que sur plusieurs espèces ornementales.

En France, la bactérie avait été précédemment isolée en 2012 par l'Anses-LSV lors d'interceptions à l'importation de caféiers (*Coffea arabica* et *C. canephora*) originaires d'Equateur et du Mexique. Ces souches avaient été positionnées phylogénétiquement par MLSA (Multi Locus Sequence Analysis, [annexe 1](#)) à l'INRA d'Angers (EMERSYS, UMR1345 IRHS). Les génomes de ces isolats ont été séquencés et une analyse de génomique comparative a été conduite (article en projet). Fin 2014 et courant 2015, de nouveaux lots de caféiers d'ornement en provenance du Costa Rica et du Honduras, via les Pays-Bas, ont été interceptés par les inspecteurs des services phytosanitaires et la présence de *Xylella fastidiosa* a de nouveau été confirmée.

Par ailleurs, la bactérie a été signalée en Iran en 2014 sur vigne et amandier (Amanifar et al., 2014).

Un plan de surveillance national de *Xylella fastidiosa* a été publié et diffusé le 13 mai 2015 aux DRAAF, DAAF et DD(CS)PP (destinataire d'exécution), ainsi qu'à tout public (Ordre de service d'action / Instruction technique DGAL/SDQPV/2015-449 du 13/05/2015).

Xylella fastidiosa est une bactérie listée dans l'annexe 1, partie A, chapitre 1 de la directive 2000/29/CE. Il s'agit également d'un organisme de lutte obligatoire de façon permanente sur tout le territoire français, au sens de l'arrêté du 31 juillet 2000 modifié. *X. fastidiosa* est également classée en A1 sur la liste de l'OEPP.

Symptômes

Les symptômes sur plantes les plus représentatifs dus à *X. fastidiosa* sont les brûlures foliaires, rappelant ceux provoqués par un stress hydrique, allant de quelques dessèchements sur feuilles au dépérissement complet de la plante (cas sur olivier dans les Pouilles et sur la vigne en Californie selon les cépages). Sur oranger, la présence de la bactérie se signale par une chlorose des feuilles et la taille réduite des fruits. Des chloroses peuvent également être relevées sur cafiers. Les symptômes sur pêcher (*Prunus persica*) et sur luzerne (*Medicago sativa*) sont d'une toute autre nature, avec des plantes présentant notamment un port ramassé. Sur vigne, des défauts de lignification des rameaux (aoûttement), et la persistance des pétioles après la chute des limbes desséchés sont observés.

Cela étant, la bactérie peut avoir un comportement de type endophage, avec pour conséquence **l'existence de végétaux contaminés asymptomatiques qui peuvent passer inaperçu à l'occasion de contrôles visuels. Ce point est important à prendre en compte car il est de nature à compliquer la recherche des sources potentielles d'inoculum et à compliquer les possibilités d'éradication.**

Note spécifique aux Citrus en général et clémentiniers en particulier (suite aux questionnements des responsables de la filière en corse)

A notre connaissance, la sous-espèce *multiplex* trouvée en Corse n'a jamais été signalée sur *Citrus*. Dans l'appendice B ("List of host plants of *Xylella fastidiosa* on the base of literature search") du rapport de l'EFSA (2015), il est fait mention page 195 d'une publication de Schuenzel et al. (2005) qui relaterait la présence de la sous-espèce *multiplex* sur *Citrus* mais il s'agit d'une erreur. Dans cette publication, les auteurs utilisent une séquence de la sous-espèce *pauca*, isolée sur *Citrus* (9a5c, CVC18) pour enracer leur arbre phylogénétique, qui contient des séquences ADN de la sous-espèce *multiplex* isolée, sur amandiers, chênes, pruniers et pêchers en Amérique du Nord. Aucun *Citrus* n'y est jamais mentionné comme hôte de la sous-espèce *multiplex*.

Recommandations :

Initier la construction d'un site web (en français), présentant la bactérie et insistant sur les différences entre espèce, sous-espèce et lignées génétiques. Le site web pourrait contenir pour chaque sous-espèce de *Xylella fastidiosa*, sa répartition géographique et la liste des plantes hôtes, avec des références bibliographiques explicites afin de dissiper toute incompréhension. Les listes seraient complétées par un comité d'experts au fur et à mesure de l'avancée des connaissances.

Il semble également important de faire une phylogénie globale de toutes les séquences disponibles sur la base de référence PubMLST pour toutes les sous-espèces/souches de *Xylella fastidiosa* (et de la compléter en temps réel) afin de tester des hypothèses de conservatisme de niche (e.g. spécificité d'hôte de certaines lignées) pour améliorer les prédictions du risques associé à l'arrivée d'une souche avec un profil allélique donné.

Rappels des connaissances sur les vecteurs de *Xylella fastidiosa*

Une maladie transmise par des vecteurs piqueurs-suceurs

***Xylella fastidiosa* est une bactérie qui se transmet de plante en plante essentiellement par l'action d'un insecte piqueur-suceur, qu'on appelle un vecteur** (Severin, 1950). Seuls quelques groupes apparentés d'hémiptères, appartenant tous au sous-ordre des Auchénorrhynches, sont connus comme vecteurs efficaces de la maladie. Il s'agit essentiellement de cicadelles, de cercopes, d'aphrophorides et éventuellement de cigales, que nous appellerons dans la suite de ce texte « cicadelles » (Young, 1968; Redak et al., 2004; Almeida, 2007; De Miranda et al., 2009; Zhang et al., 2011). Tous ces insectes ont en commun **une capacité à enfoncer profondément leur rostre dans la plante et à aspirer avec force la sève directement dans les vaisseaux conducteurs du xylème** (sève brute) (Almeida and Backus, 2004). Pour cela, ils disposent d'une partie avant de la tête élargie (clypéus) contenant une forte musculature reliée à un diaphragme qui permet l'aspiration de la sève depuis le xylème soumis à une forte tension négative (la sève étant en conséquence difficile à aspirer). Ces insectes suceurs de sève dans le xylème s'alimentent sur une gamme de plantes plus diverse et plus large, que les cicadelles piquant le phloème.

La transmission de la bactérie par le vecteur se fait suivant trois étapes : 1) **acquisition** de la bactérie par le vecteur en aspirant la sève d'une plante infectée par *Xylella fastidiosa* ; 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 alimentation de l'insecte (Redak et al., 2004). Les larves de ces insectes peuvent aussi transmettre la maladie, mais comme elles n'ont pas d'ailes elles ne peuvent la transmettre qu'à des plantes adjacentes. **La larve en devenant adulte perd la bactérie qui reste accrochée à la mue de l'insecte ni entre les stades larvaires et l'adulte.** La transmission par une cicadelle adulte se fait uniquement par ses pièces buccales, la maladie n'étant pas transmise par d'autres voies. Ainsi **pour les insectes qui passent l'hiver sous forme d'œufs, les jeunes larves ne seront pas infectieuses** au printemps suivant (Freitag, 1951). **L'adulte en consommant la sève d'une plante infectée est immédiatement apte à transmettre la maladie** (la plus courte période de latence observée étant de 2h)(Severin, 1949; Rodas, 1994), la bactérie se multipliant dans la cavité buccale **l'insecte restera infectieux pendant plusieurs mois** (Purcell and Finlay, 1979; Hill and Purcell, 1995). La présence de quelques cellules bactériennes permet à l'insecte de transmettre la maladie. Les adultes de ces cicadelles y compris les cigales (dont la taille varie de 4 à 45 mm) volent relativement mal et leur capacité de dispersion est relativement faible (de l'ordre de la centaine de mètres dans leur vie).

Des vecteurs européens méconnus et restant à identifier précisément

Les connaissances sur les vecteurs efficaces de la maladie sont essentiellement confinées aux vecteurs américains. En effet, 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. A ce jour, il a été montré que seule une espèce d'aphrophoride: ***Philaenus spumarius* L. est capable de transmettre la maladie aux pervenches de Madagascar en Italie, mais la transmission aux oliviers n'a pas été possible** (Saponari et al., 2014b) et que deux autres espèces: *Neophilaenus campestris* Fallén (Aphrophoridae) and *Euscelis lineolatus* Brullé (Cicadellidae) peuvent porter la maladie, sans que leur capacité à la transmettre ait pu être démontrée. *Philaenus spumarius* est une espèce habitant aussi l'Amérique du Nord, elle était déjà connue comme un vecteur peu efficace en Amérique du Nord, depuis des travaux datant des années 50. Cette espèce **extrêmement polyphage (elle attaque près de 1000 espèces végétales)** peut se rencontrer en grand nombre dans de nombreux milieux anthropisés ou sub-naturels (haies, prairies, cultures, jardins, zones marécageuses, bords de rivière, prairies d'altitude, forêts). Les densités en individus sont fréquemment élevées 1280 larves /m² et 466 adultes/m² dans des champs de luzerne, le maximum atteignant 6680 larves par m², la moyenne étant inférieure à 1000 larves par m². Cette espèce est fréquente en Corse mais montre une estivation longue qui rend sa capture impossible en été (Yurtsever, 2000).

La liste des espèces susceptibles de transmettre la maladie en Europe (voir [annexe 2](#)), et pour lesquelles il faudra démontrer leur capacité de vecteurs efficaces, compte 119 espèces et inclut 74 espèces de cigales dont beaucoup ont des aires de distribution restreintes et ne sont probablement pas impliquées dans la vection de la maladie. **52 espèces sont présentes en France et 11 en Corse** (si on compte une espèce découverte lors de notre mission).

X. fastidiosa colonise aussi bien le xylème de la plante que la cavité buccale de l'insecte

X. fastidiosa se multiplie dans la cavité buccale de l'insecte (Almeida and Purcell, 2006). Alors qu'il est difficile de voir la bactéries au microscope à balayage dans les premiers jours de la contamination, après quelques jours, de petites colonies bactériennes sont visibles dans le cibarium et le précibarium de l'insecte et après deux semaines les parois des pièces buccales sont couvertes d'un tapis bactérien. L'attache de la couche unicellulaire de bactéries à la paroi cuticulaire de l'insecte se fait dans une matrice dont la consistance rappelle une gomme. Ce biofilm recouvrant la cavité buccale de l'insecte, composé d'une matrice et d'une couche de cellules de *X. fastidiosa*, protégerait la bactéries des forts courants dus à l'ingestion des sèves et compenserait la carence nutritionnelle liée à l'extraction de la bactéries de sa plante-hôte (Killiny et al., 2013). En dépit du grand nombre de cellules bactériennes recouvrant la paroi buccale de l'insecte, **il semble qu'un nombre relativement faible de cellules bactériennes viables (env. 200) soit suffisant pour une transmission efficace**. Ce résultat suggère que seule une petite partie de la cavité buccale est impliquée dans la transmission de *X. fastidiosa* aux plantes (Hill and Purcell, 1995; Almeida and Purcell, 2003).

Xylella fastidiosa utilise des facteurs signal diffusibles (DSF), une famille d'acides gras non-saturés, qui régule son comportement en fonction de la densité de cellules bactériennes

(Chatterjee et al., 2008). **Les facteurs DSF jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à la formation de biofilm et à la multiplication bactérienne in planta.** En effet, ces DSF suppriment la motilité et stimulent la production d'adhésines à la surface de la bactérie, qui facilitent l'agrégation bactérienne, l'attachement aux surfaces et la formation de biofilm (Newman et al., 2004; Chatterjee et al., 2008; Wang et al., 2012; de Souza et al., 2013; Ionescu et al., 2014). La biosynthèse et la détection des DSF sont dépendantes d'un gène *rpfF* (facteurs de régulation de pathogénie). L'interaction de *X. fastidiosa* avec les insectes vecteurs est donc largement influencée par le locus *rpfF* (Newman et al., 2004). Un mutant $\Delta rpfF$ de *X. fastidiosa*, dont la production de DSF est bloquée, montre une plus forte virulence sur vigne et une moindre capacité à s'accrocher au verre et aux parois des plantes qu'une souche non mutée. Cette hypervirulence du mutant $\Delta rpfF$ est associée à un nombre cinq fois plus important de vésicules de membrane externe (OMV) dans les plantes infectées. La fréquence d'accroche de *X. fastidiosa* aux vaisseaux xylémiques est 20 fois inférieure en présence d'OMV. La production d'OMV semble être un moyen d'adapter sa capacité d'accrochage entre la surface cuticulaire de l'insecte vecteur qui nécessite un fort niveau d'attache (faible nombre d'OMV) et sa dispersion systémique dans les vaisseaux de la plante qui est favorisée par une faible capacité d'attache aux parois, elle-même induite par une augmentation des OMV. Ceci lui permet de coloniser efficacement le xylème de sa plante-hôte en migrant contre le flux de sève. **Ces connaissances mettent en évidence les interactions spécifiques que cette bactérie a mis en place avec ses vecteurs potentiels. Elles permettent aussi d'envisager de nouvelles méthodes de lutte, qui dérégleraient ces mécanismes moléculaires sous-tendant l'interaction vecteur-vecté, mais de nombreux aspects de cette relation restent encore à explorer.**

Bactéries, vecteurs et plantes-hôtes influencent la prévalence de la maladie

Dans le cas de pathogènes généralistes – comme *X. fastidiosa* – **les différentes lignées bactériennes, les espèces de vecteurs et les plantes-hôtes impliquées contribuent toutes à la variabilité observée de la prévalence de la maladie.** Purcell (1981) a proposé une analyse de la transmission de *Xylella fastidiosa* par des cicadelles en utilisant des modèles de transmission basés sur des distributions normale ou de Poisson. Ces modèles cherchaient à prédire la probabilité de transmission en fonction de différentes variables : 1) l'abondance des vecteurs, 2) l'efficacité d'inoculation, 3) la durée de la période d'alimentation.

L'efficacité d'acquisition de la bactérie par un vecteur est directement dépendante de la population du phytopathogène dans les plantes d'alimentation du vecteur. La valeur seuil pour une acquisition de la bactérie par l'insecte se situant autour 10^4 cellules viables par gramme de tissu et un peu plus pour la vigne (de l'ordre de 10^6 à 10^7 cellules bactériennes par gramme de tissu) (Hill and Purcell, 1997).

L'efficacité d'acquisition est aussi positivement corrélée à la durée d'alimentation sur sa plante hôte (Purcell and Finlay, 1979; Hill and Purcell, 1995; Almeida and Purcell, 2003; Daugherty and Almeida, 2009; Daugherty et al., 2009). Des études ont montré l'importance

de la durée et de la fréquence des périodes d'alimentation – elles-mêmes liées aux teneurs en eau de la plante - sur le taux de transmission de la bactérie. L'analyse du comportement d'alimentation de *H. vitripennis* sur Citrus [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] et amandier [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] montre que les cicadelles localisent les vaisseaux du xylème et ingèrent la sève sous des pressions de -5.5 to -33.0 bars and -6.0 to -24.5 bars respectivement (Krugner and Backus, 2014). Les insectes s'alimentant sur des plantes faiblement irriguées montrent des périodes d'alimentation plus courtes et moins fréquentes que ceux alimentés sur des plantes peu irriguées. **Ceci suggère que des niveaux faibles de stress hydrique pourraient réduire la diffusion de *X. fastidiosa* dans les cultures (Krugner and Backus, 2014).** En conséquence, de faibles populations bactériennes, ainsi que de courtes périodes d'alimentation du vecteur réduisent donc fortement la probabilité d'acquisition de la bactérie par le vecteur. Purcell (Purcell, 1981), a aussi montré **que le nombre de vecteurs est positivement corrélé au taux de transmission de *X. fastidiosa*** (Costa et al., 2000).

La transmission de *Xylella fastidiosa* est dépendante de la proportion de plantes infectées dans une population. **Ainsi, plus le niveau d'infestation sera élevé, plus la probabilité sera élevée qu'un vecteur se nourrisse sur une plante infectée, acquiert la maladie et la transmette à une plante saine** (Almeida, 2007).

En conséquence, pour les vecteurs américains, l'efficacité de transmission de *X. fastidiosa* varie fortement en fonction de la combinaison espèces de vecteurs, espèces de plantes infectées, organisation spatiale des plantes etc. **Certaines espèces de vecteurs transmettent moins bien la maladie à certaines plantes que d'autres** (Daugherty et al., 2009), alors que ces dernières espèces de vecteurs sont eux-mêmes moins efficaces sur d'autres plantes (Purcell, 1980, 1989). Ainsi aux Etats-Unis, *Draeculocephala minerva* transmet moins efficacement que *Graphocephala atropunctata* la maladie à la vigne alors que c'est l'inverse pour la transmission de la même souche bactérienne à la luzerne. **Les caractéristiques de la cavité buccale des insectes semblent impliquées dans l'efficacité de la vection.** Les taux de succès de la transmission variant aussi en fonction des espèces de plantes, voire des hauteurs d'alimentation des vecteurs sur la plante (collet versus tiges plus élevées).

Peu de travaux (pour ne pas dire aucun) ont analysé l'importance relative de ces différents facteurs dans un cadre synthétique prédisant la capacité de transmission de *X. fastidiosa* par différents vecteurs, à différentes périodes et en fonction de différents paramètres (Daugherty and Almeida, 2009).

De plus, le climat et plus précisément **la température semblent jouer un rôle important sur la survie de *Xylella* dans la plante, mais aussi dans la performance des vecteurs**, ainsi que leur comportement d'alimentation. **L'efficacité de certains vecteurs est positivement corrélée à la température** (i.e. *Homalodisca vitripennis*) alors que d'autres vecteurs (i.e. *Graphocephala atropunctata*) ont des mortalités et des efficacités de vection qui répondent de manière non linéaire à la température. Les températures élevées induisant des efficacités de transmission maximales, mais aussi de forts taux de mortalité (Daugherty et al., 2009).

Enfin, en Californie, l'**organisation spatiale de la maladie de Pierce dans les vignes est fréquemment dépendante des plantes-hôtes les plus fréquentes dans l'habitat**, sources de l'inoculum, et des espèces de vecteurs les plus fréquentes et nombreuses pouvant disperser entre ses deux habitats. **Les vecteurs appréciant les lieux humides et ceux-ci hébergeant de nombreuses espèces hôtes de *Xylella*, les foyers de maladie sont plus fréquents à proximité de ces zones** et la distribution spatiale de la maladie suggère que les insectes vecteurs diffusent la maladie dans les vignes à partir de ces zones. La maladie se répand dans la vigne alors que les observations de vecteurs consommant la vigne sont extrêmement rares. Puis la bactérie est transmise par d'autres vecteurs de pied à pied, favorisant ainsi la dynamique explosive de la maladie.

Conclusions, Recommandations :

Les vecteurs potentiels européens de *Xylella* restent à découvrir, et leur biologie est très mal connue (en particulier leurs plantes d'alimentation et les plantes-hôtes). De même leur cycle biologique et le nombre de générations annuelles restent à décrire en Corse. Leurs préférences trophiques sont mal connues et le recouplement avec des plantes hôtes de la maladie reste à découvrir. Des études biologiques doivent être menées urgemment.

L'épidémiologie de la maladie dans un contexte méditerranéen n'a jamais été décrite de manière argumentée. Peu de travaux (pour ne pas dire aucun) ont analysé l'importance relative des différents facteurs prédisant la capacité de transmission de *X. fastidiosa* par différents vecteurs, à différentes périodes et en fonction de différents paramètres. Il est important d'acquérir des données permettant de mieux connaître les interactions plantes ↔ *Xylella* ↔ vecteurs.

Contexte corse et lettre de mission

Le premier foyer de *Xylella fastidiosa* en Corse a été découvert le 22 juillet 2015 sur des plants de *Polygala myrtifolia*, présentant des symptômes de brûlures foliaires, sur la commune de Propriano en Corse du Sud.

Notre mission d'expertise a été sollicitée par la DGAL le 31 juillet 2015 (lettre de mission en [annexe 3](#)). Nous nous sommes rendus en Corse du 3 au 11 août 2015 et avons suivi le calendrier fourni en [annexe 4](#) afin de répondre au mieux à la demande.

Le plan du rapport suit celui de la lettre de mission et ses conclusions sont basées sur les éléments de la situation corse portés à notre connaissance au 26 août 2015 et que l'on peut résumer comme suit :

1) **56 foyers de *Xylella fastidiosa* sous-espèce *multiplex* sur *Polygala myrtifolia* dont 1 foyer abritait également 5 pieds de *Spartium junceum* (faux genêt d'Espagne) également positifs pour *Xylella fastidiosa* sous-espèce *multiplex*.** La carte des foyers est présentée en [figure 1](#). Deux souches de *X.f multiplex* ont été identifiées par analyse multilocus (MLSA, cf [annexe 1](#)) à l'INRA d'Angers. La différence entre les deux profils alléliques se situe au niveau d'un seul locus, cysG. La souche trouvée à Propriano correspond aux souches connues Griffin-1 (isolée sur *Quercus rubra*) et M12 (isolée sur amandier), alors que pour tous les autres échantillons, la souche correspond à la souche Dixon (isolée sur amandiers). Des analyses supplémentaires sont en cours pour confirmer ces résultats. On note que dans la base de données de référence contenant l'ensemble des profils alléliques des différentes souches séquencées par MLST à ce jour (<http://pubmlst.org/xfastidiosa/>), les plantes hôtes depuis lesquelles les souches de type Griffin-1 (cysG_7; ST 7) ont été isolées sont *Olea europaea*, *Salvia mellifera*, et *Prunus dulcis*. Pour les souches type Dixon (cysG_3), les hôtes d'isolation sont beaucoup plus diversifiés (55 enregistrements pour 26 espèces de plantes hôtes : *Acer griseum*, *Acer rubrum*, *Alnus rhombifolia*, *Ambrosia trifida*, *Ampelopsis cordata*, *Celtis occidentalis*, *Cercis canadensis*, *Cercis occidentalis*, *Chionanthus sp.*, *Gleditsia triacanthos*, *Helianthus sp.*, *Iva annua*, *Liquidambar styraciflua*, *Prunus armeniaca*, *Prunus cerasifera*, *Prunus domestica*, *Prunus dulcis*, *Prunus persica*, *Prunus sp.*, *Quercus rubra*, *Ratibida columnaris*, *Sapindus saponaria*, *Solidago virgaurea*, *Ulmus crassifolia*, *Vinca sp.*, *Xanthium strumarium*).

2) **Tests négatifs pour la présence de la bactérie sur tous les végétaux collectés par les services de l'Etat à proximité des foyers (252 prélèvements).**

3) **Tests négatifs pour tout le continent (quelle que soit l'espèce de plante testée).**

Des analyses sont encore en cours. Si de nouveaux éléments devaient apparaître dans les semaines / mois suivant la restitution de ce rapport, certaines de nos conclusions devraient être revues.

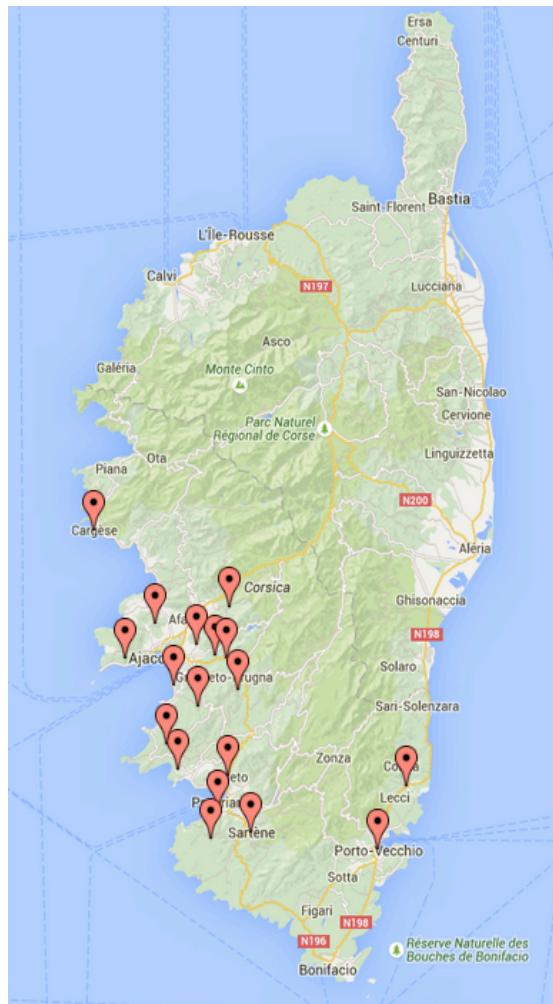


Figure 1. Carte des foyers de *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* au 26 août 2015,
source DGAL – Mission des urgences sanitaires, Paris

Objectif 1 - Appui aux services de l'Etat sur place dans le cadre de l'enquête épidémiologique sur l'origine du foyer

1.1. Appui méthodologique aux prélèvements d'échantillons et à la capture d'insectes vecteurs

Plusieurs réunions visant à un transfert des connaissances ont été organisées avec les services de l'Etat présents en Corse (calendrier de mission en [annexe 4](#)). Des prélèvements plantes/insectes ont été réalisés en présence des missionnaires et des agents des services de l'Etat présents en Corse.

1.1.1. Pour les échantillons de végétaux à analyser

Il apparaît que l'Ordre de service d'action / Instruction technique DGAL/SDQPV/2015-449 du 13/05/2015 l'objet est le plan de surveillance *Xylella fastidiosa*, doit être réactualisé et prendre en compte la situation actuelle en Corse.

Il est fortement recommandé que soit rédigé un document de type mode opératoire – instruction pour le prélèvement sur végétal adapté au contexte actuel afin de répondre au mieux au plan de surveillance et aux recherches épidémiologiques en cours. Ce document devrait reprendre la liste des plantes hôtes décrite dans le document (opinion scientifique) de l'EFSA publié en 2015 (avec correction des erreurs relevées), laquelle précise la sensibilité des espèces aux différents taxons de *Xylella fastidiosa*, ainsi que la liste des végétaux spécifiés de la décision d'exécution (UE) 205/789 DE LA COMMISSION du 18 mai 2015.

Sur foyer avéré, il est recommandé de réaliser des prélèvements sur les végétaux présentant des symptômes suspects, sur les végétaux spécifiés à proximité du végétal infecté (totalité des végétaux spécifiés présents dans les 15 m avec un maximum de 5 végétaux par espèce spécifiée).

Les mesures de désinfection des outils et des mains des opérateurs entre chaque site de prélèvement devront être décrites (utilisation d'un produit bactéricide).

En cas doute sur l'identification du végétal prélevé, il est recommandé au préleveur de réaliser une photographie de la plante avec la référence du prélèvement.

Il a été rappelé que la constitution de pool de végétaux pour analyse est à bannir. Un échantillon pour analyse ne doit être constitué que de prélèvements réalisés à partir d'un seul individu végétal, sans quoi la traçabilité de l'échantillonnage serait compromise.

1.1.2. Pour la capture d'insectes vecteurs

1.1.2.1. Méthodes d'échantillonnage recommandées

De nombreuses méthodes sont utilisables pour capturer les insectes potentiellement vecteurs de *X. fastidiosa* : à l'aide d'un filet fauchoir (technique utilisée lors de la mission) / par battage avec un parapluie japonais / à l'aide d'aspirateurs mécaniques (D-Vac) / en utilisant des panneaux chromo-attractifs jaunes collants (pièges à glu) / en utilisant des pièges enfoncés dans le sol (pièges Barber). Des pièges lumineux, des pièges de type tente Malaise sont également disponibles, tout comme des pièges alimentaires et des pièges sexuels (utilisation de phéromones) mais ces derniers sont peu utilisés pour la capture des hémiptères. **Nous fournissons en [annexe 5](#) des détails sur les méthodes de piégeage recommandées pour la capture des vecteurs potentiels de *Xylella fastidiosa*. On notera que pour les cigales, la meilleure méthode reste de loin la chasse à vue (à l'audition) avec capture manuelle des insectes.**

Chaque technique produit des résultats différents quant aux espèces capturées et l'association de plusieurs techniques est nécessaire pour recenser et évaluer exhaustivement les populations d'Auchenorrhyncha (Payne, 1981; Törmälä, 1982; Standen, 2000; Stewart, 2002).

L'écologie et le comportement des espèces visées influencent le choix de la technique de capture. Il faut prendre en compte la(es) plante(s)-hôte(s) préférentielle(s) et la possible stratification verticale des espèces. La plupart des espèces choisissent en effet une strate particulière dans une structure végétale. Cette stratification peut être modifiée par les rythmes diurnes et saisonniers, l'activité de vol, le comportement alimentaire. On peut observer des différences de fréquence au niveau des sexes capturés, par exemple les mâles sont souvent plus présents dans des pièges Barber car ils sont en général moins sédentaires que les femelles. De même, les différents stades de développement (larves et adultes) ne seront pas forcément capturés avec les mêmes techniques.

Le nombre et l'emplacement des échantillonnages doivent tenir compte de l'importance des facteurs spatiaux. **L'occurrence et/ou l'abondance des insectes peuvent-être hautement corrélées à des facteurs environnementaux clés (comme la nature du sol, la composition ou l'aspect de la végétation, la saison, la température du jour de chasse etc.).**

Le coût est un facteur qu'il faut prendre en compte et qui peut être limitant. Il inclut le coût du matériel, le temps dévolu pour réaliser l'échantillonnage mais aussi le temps nécessaire pour étudier le matériel récolté : tri, identification. Ce temps post-échantillonnage est souvent sous-estimé. Le paramètre humain est souvent le facteur le plus limitant d'une approche faunistique bien argumentée.

Les pièges englués permettent en général de récolter la plupart des espèces cibles (cigales exclues), ces pièges étant posés sur une durée longue, en comparaison de la succion ou du fauchage qui sont limités dans le temps. Un recensement fiable des espèces présentes et un suivi de l'infection des populations pourrait être réalisé en utilisant des équipements simples, peu coûteux et portables (par exemple fauchage/battage et pièges à glu photo-chromatique).

Pour réaliser des études quantitatives les techniques utilisées devront être standardisées, pour pouvoir être répliquées.

*1.1.2.2. Recommandations pour le stockage des insectes collectés en vue de la détection de *Xylella**

Une procédure détaillée est fournie en [annexe 6](#). Brièvement, les insectes capturés, doivent être placés dans l'éthanol 75 puis transvasés dans l'éthanol 96 dans des contenants qui empêchent l'évaporation du solvant. L'éthanol doit ne contenir aucun additif et sa dilution doit être réalisée avec de l'eau osmosée.

Le volume d'insectes ne devra pas dépasser le tiers du volume d'éthanol. Le stockage pourra se faire à 4°C sur une courte période ou à -20°C sur une période plus longue en évitant les cycles de congélation / décongélation. Les tubes doivent être lisiblement et précisément étiquetés. L'idéal est de consigner informatiquement les informations de collecte.

Pour la préservation de l'ADN les méthodes de collecte qui utilisent un mouillant sont déconseillées.

Les pièges à glu présentent un intérêt certain pour les suivis épidémiologiques car leur pose et leur relève est facile. Certains auteurs ont constaté que la détection de *Xylella fastidiosa* était possible sur des insectes laissés une petite dizaine de jours au soleil sur des pièges à glu (Bextine et al., 2005; Mitchell et al., 2009; Brady et al., 2012). **Cette approche, si elle est maîtrisée et vérifiée, pourrait ouvrir des perspectives intéressantes.** Elle nécessite cependant la construction préalable d'une base de données de codes-barres génétiques (voir Objectif 3, §3.1.3) qui permettra d'identifier les insectes sur la base de leur ADN et donc de s'affranchir de l'étape d'identification morphologique des spécimens récoltés (cf Objectif 2).

Conclusions et Recommandations :

- L'ordre de service d'action / Instruction technique DGAL/SDQPV/2015-449 du 13/05/2015 l'objet est le plan de surveillance *Xylella fastidiosa*, doit être réactualisé et prendre en compte la situation actuelle en Corse.
- La constitution de pool d'échantillons, actuellement pratiquée ponctuellement, est à proscrire (un échantillon = un individu végétal).
- Plusieurs réunions visant à un transfert des connaissances ont été organisées avec les services de l'Etat présents en Corse au moment de la mission
- Des méthodes simples et peu coûteuses pourraient être utilisées en combinaison afin de recenser les espèces de vecteurs potentiels présentes en Corse (fauchage / battage + pièges à glue – chasse à vue pour les cigales) et suivre le taux d'infection des populations.
- Le plus coûteux est l'investissement humain (temps de chasse et temps de tri des échantillons récoltés)
- Le recensement précis des informations de collecte est recommandé
- L'utilisation de pièges à glu pour la capture d'insectes à des fins de détection moléculaire de *Xylella* semble prometteuse mais devra être validée. Elle nécessitera le développement d'une base de données de codes-barres moléculaires pour permettre l'identification des insectes sans nécessité de s'appuyer sur des critères morphologiques (étape fastidieuse et parfois impossible (femelles)).

1.2. Appui à l'analyse épidémiologique de la situation et appui à l'interprétation des données recueillies par les services en charge de protection des végétaux sur la détermination de l'origine du foyer

Les premières données recueillies par les services en charge de la protection des végétaux et par notre mission sont déjà en cours d'exploitation et vont continuer de l'être intensivement dans les mois futurs.

1.2.1. Paramètres importants à documenter sur les foyers

Pour pouvoir suivre et comprendre une potentielle épidémie en temps réel, nous produisons ci-dessous une liste de paramètres qu'il conviendra de documenter sur les foyers futurs ou sur les sites de suivi temporel que nous pensons important de mettre en place rapidement.

Les informations que nous préconisons d'acquérir ne diffèrent que peu des paramètres actuels mais il nous a semblé important de les lister et d'ajouter quelques informations supplémentaires qui pourraient aider les épidémiologistes à l'avenir. Il est important de pouvoir **mettre en relation les cas positifs avec un effort de surveillance**.

Les données de surveillance – **y compris celles produisant des résultats négatifs au test de détection** - doivent obligatoirement comprendre les données suivantes :

- Un numéro unique de site (foyer) et de collecte, si possible emboités.
- Les coordonnées géographiques de l'endroit du/des prélèvements (si possible en individualisant les plantes).
- La date de la récolte et le nom du récolteur (pour la traçabilité).
- L'identification de la plante-hôte ou une photographies des feuilles / fleurs (une photographie des symptômes serait également pertinente)
- La liste des plantes observées à proximité (rayon de 50 m), on identifiera dans un second temps celles connues pour être hôtes de *Xylella fastidiosa*.
- Une idée de la densité des plantes contaminées basées sur une typologie simple 3-4 cas prédéterminés et explicités
- Si possible un fauchage des insectes potentiellement vecteur au moment de la collecte sur les plantes contaminées et les plantes adjacentes, et préservé dans les conditions optimales (voir Annexes [5](#) et [6](#)). Idéalement la durée du fauchage des plantes devrait être mentionnée (ex 15mn).
- Dans le cas de prospection dans un milieu cultivé ou semi-naturel, des données comme la durée de la recherche des plantes contaminées et le nombre de personnes réalisant la prospection.

Idéalement ces données devraient pouvoir être saisie en temps réel, via un Smartphone ou une tablette dans une base de données simple d'utilisation, de façon à ne pas être l'objet de multiple traitements (source d'erreur) et d'être immédiatement utilisables pour des analyses subséquentes.

Dans un second temps ces sites (en fonction des résultats des tests) **pourront être plus précisément décrits**. Ses descripteurs pourraient comprendre :

- Les variables climatiques (pour les sites expérimentaux de suivis à moyen terme ; liste à établir).
- Des données d'humidité, ou de présence de points d'eau (à identifier plus précisément).
- Des données tendant à identifier la fragmentation locale des hôtes potentiels de *Xylella* (à identifier plus précisément).
- Des données édaphiques (pH, etc) qui pourraient être complétées a posteriori par des données de cartes pédologiques ou géologiques (à identifier plus précisément).

Ces données supplémentaires pourraient intervenir dans les modèles, quelques soient leurs échelles et permettre d'identifier à posteriori – en imaginant qu'un suivi pluriannuel soit mis en place - quelles configurations locales ont pu mener à des extinctions locales du foyer (i.e. une extinction d'une population mais pas de la métapopulation).

1.2.2. Parcelles ou sites témoins

Il apparaît stratégique et important **de pré-définir des sites d'intérêt pour suivre une éventuelle épidémie** ou une future colonisation d'un autre agent phytopathogène. Ces sites **permettraient de faire du suivi sur la durée dans des parcelles témoins**.

Ils devraient être **des habitats représentatifs de la diversité des agro-écosystèmes corses** (agriculture, sylviculture et conservation).

Il est possible que des parcelles de ce type existent déjà (i.e. site de San Giuliano INRA) et soient déjà l'objet d'un certain nombre de mesures. Il **conviendra de les identifier rapidement** en concertation avec l'ensemble des partenaires.

1.2.3. Utiliser les spécificités de la Corse comme observatoire d'agents phytopathogènes menaçant l'agriculture ou la sylviculture nationale, dans un contexte de réchauffement climatique

L'ensemble des propositions exposées ci-dessus, **doivent être prises comme autant de développements d'outils génériques** permettant le suivi temporel et l'analyse épidémiologique de *Xylella* mais aussi de potentielles autres maladies pouvant affecter, à l'avenir, l'agriculture voire la sylviculture en zone méditerranéenne.

La position géographique de la Corse est, en ce sens, stratégique dans le bassin méditerranéen occidental. D'une part, elle **se situe à l'extrême nord d'un corridor historique de colonisation des flores et des faunes** (Tunisie / Sicile / Sardaigne / Corse). D'autre part, elle est **au cœur d'une zone de denses échanges commerciaux et humains**, entre la France continentale et l'Italie continentale et insulaire (Sardaigne). Largement visitée en période estivale, elle est soumise à un risque fort d'importation accidentelle de **bioagresseurs**.

Son positionnement au sud de la France continentale est idéal pour étudier et anticiper les effets du réchauffement climatique sur la remontée des bioagresseurs au sens large.

Son climat, légèrement plus chaud que celui de la France continentale, la situe dans un contexte climatique qui ressemble à celui du sud de la France continentale dans quelques années. La position géographique de la Corse est un atout majeur pour pouvoir étudier, suivre et contrôler des populations de bioagresseurs qui menaceront probablement les cultures du sud de la France continentale d'ici quelques années. Elle **permet de développer aujourd'hui et de tester des outils génériques** que nous pourrions mettre en place et qui nous serons utiles pour gérer les bioagresseurs futurs.

Elle **héberge des plantes cultivées clés (vigne, olive, Prunus, Citrus etc.) dans l'économie méditerranéenne. Sa naturalité permet d'envisager des approches agro-écologiques dans des systèmes peu intensifs.** En ce sens, elle **cumule des prédispositions pour être laboratoire d'étude pertinent vis-à-vis des pays environnants, dès lors qu'un réseau de collaboration et d'échanges et des projets communs se mettent en place avec les laboratoires continentaux.**

Enfin l'insularité de la Corse, confère probablement à de nombreux milieux une résilience moindre que des habitats continentaux et donc une probabilité d'établissement plus importante d'organismes invasifs nuisibles aux cultures. En cela, elle peut permettre à ces organismes de s'installer, de s'adapter à ces nouvelles conditions, et de pouvoir ensuite coloniser de nouveaux habitats à plus forte résilience (notion de populations tête de pont actuellement privilégiée dans l'étude des invasions).

La mise en place – à moyen terme – de tels outils est d'une grande importance pour pouvoir mieux comprendre, anticiper et gérer de futures colonisations d'agents phytopathogènes menaçant l'agriculture et la sylviculture française dans son ensemble. Il semble aujourd'hui important vu les coûts économiques des introductions récurrentes d'agents phytopathogènes ou ravageurs des cultures françaises, **de basculer dans une approche anticipant les problèmes plutôt que de rester dans un système qui trop souvent les subit.** L'arrivée de *Xylella fastidiosa* en Corse, la nécessité de développer une approche anticipative de la biosurveillance, doivent agir comme des catalyseurs pour développer des outils génériques permettant de mieux anticiper et *in fine* de mieux contrôler les agents phytopathogènes menaçant l'agriculture française voire européenne dans le contexte général de réchauffement climatique.

Conclusions et Recommandations :

- Les données de surveillance d'une récolte doivent comprendre : 1) Un numéro unique de foyer et de collecte ; 2) les coordonnées géographiques ; 3) La date et le nom du récolteur ; 4) Le nom de la plante-hôte ; 5) une liste de plantes (dans un rayon de 50m) ; une typologie de la densité des plantes montrant des symptômes.
- Pour l'analyse épidémiologique, il est important de pouvoir mettre en relation le nombre de cas positifs avec un indicateur d'intensité de la surveillance pour une aire géographique donnée.
- Une collecte de vecteurs par fauchage doit être réalisée.
- Pré-définir des parcelles témoins dans des habitats représentatifs de la diversité des agro-écosystèmes corses afin de suivre une éventuelle épidémie.
- Il est important de mieux utiliser les spécificités de la Corse comme observatoire d'agents phytopathogènes menaçant l'agriculture ou la sylviculture nationale, et ceci dans un contexte de réchauffement climatique.
- Pour maîtriser les maladies des plantes il est urgent d'investir dans des outils génériques et de basculer vers des approches anticipant l'arrivée des bioagresseurs

1.3. Propositions d'exploitations possibles des données recueillies

Nous proposons une exploitation des données à, au moins, **trois niveaux emboités répondant à des questionnements présents ou futurs différents**:

- 1) un **niveau local** plutôt situé au niveau des parcellaires pour mieux comprendre **comment la diffusion de la maladie se ferait entre des zones semi-naturelles adjacentes et des zones de cultures** (par exemple *Prunus*). Ce niveau permettra de renseigner les dynamiques locales et les paramètres les influençant. C'est aussi à ce niveau que se situeront les résultats des tests moléculaires sur les vecteurs collectés (porteurs ou non de la bactérie).
- 2) une échelle **intermédiaire, au niveau de la région pour essayer d'approcher la dynamique inter-localités**, chaque "localité" correspondant, par exemple, à un bassin de production, à un pépiniériste, à un importateur. C'est dans cette échelle que les sites de suivi prendront toute leur importance : leur choix est donc stratégique et demande une réflexion approfondie.
- 3) une **prévision du risque à un niveau sub-continental qui permettrait (avec des SDM - Species Distribution Modelling- ou d'autres outils) de prévoir des zones européennes de risque** en fonction du climat, de la distribution des espèces de plantes-hôtes et des vecteurs. **C'est à ce niveau que nous avons placé nos analyses de la distribution géographique potentielle de *Xylella fastidiosa* ssp. *multiplex* en Corse (voir Annexe 7)**. Ces approches permettent de guider le réseau

Les données ainsi produites par les services de l'Etat pourrait servir rapidement à :

- 1) **Modéliser la progression spatiotemporelle de la maladie**, les premiers points positifs sont autant d'informations importantes pour disposer d'une description de la situation à la découverte de l'agent phytopathogène.
- 2) **Ajuster des données de suivi de l'épidémie** (en particulier estimation statistique des capacités de dissémination). Visualiser à court terme la dynamique des données et des prédictions.
- 3) **Prédire l'expansion future, les zones à risque sur le continent**. Ce travail est ébauché et sera développé si un projet de recherche est lancé.
- 4) **Optimiser les plans de surveillance, en réduisant le nombre des zones à surveiller**, en identifiant les zones peu prospectées nécessitant une rapide intervention des agents de l'état. Par exemple un premier résultat montre qu'il est nécessaire d'aller échantillonner les *Polygala* dans la plaine orientale corse.
- 5) **Faire un état des lieux au temps 0**, sur un certain nombre de sites en particulier pour les vecteurs récoltés et ainsi situer l'état de contamination des vecteurs potentiels collectés.
- 6) **Faire une description des communautés d'insectes vecteurs efficaces en Corse**. Repérer des espèces de vecteurs sur lesquelles des tests de vécion efficace pourraient être réalisés, en conditions contrôlées.

- 7) La collecte des espèces de vecteur produit du matériel biologique qui viendra alimenter la bibliothèque de code-barres génétiques développée à l'INRA et qui facilitera l'identification de ces espèces (cf Objectif 3, 3.1.3).

1.4. Recommandations sur le formatage des données recueillies en vue de leur partage éventuel dans le cadre de projets de recherche à venir, ou de groupe de travail de la plate-forme d'épidémi-o-surveillance

Le moyen le plus efficace pour le stockage et le partage des données recueillies serait probablement de développer une base de données sécurisée, accessible via internet (implémentation et consultation), dont les tables / champs seront construits en fonction des attentes des différents acteurs.

L'expérience de quelques semaines de travail commun montre déjà quelques pistes d'action potentielle pour une amélioration de la saisie des informations colligées par les services de l'Etat. L'intérêt de tels outils est i) de réduire les erreurs de saisies par des listes pré-formatées et d'autre part, ii) de permettre à des agents d'implémenter la base sur des parties de celle-ci différentes et iii) de permettre à d'autres personnes de commencer l'exploitation de ces données formatées de manière cohérente et adéquate.

Il est certain que ce genre d'outils existe déjà dans les centres de recherche ou les laboratoires de l'Etat et pourrait être rapidement adapté aux usages nécessaires. Il est urgent de mettre en place un petit groupe de travail pour mettre à disposition des agents chargés de recueillir les données pour un suivi de la situation de *Xylella* en Corse, et ainsi de faciliter l'analyse futures de ces données par les projets de recherche et utilisateurs potentiels. Le développement d'interfaces utilisables sur Smartphone ou une tablette apparaît pertinent mais nécessite un peu de développement.

La question des moyens pour la mise en place de cette base, son hébergement (serveurs), sa gestion (implémentation par les agents + maintenance informatique) et sa pérennisation devra être posée rapidement de façon à rendre efficace la surveillance et les études qui vont continuer dans les mois à venir.

Idéalement cette base de données devrait être liée à celle permettant l'identification des vecteurs (e.g. grâce au barcoding, cf Objectif 2) et consignant les informations sur leur biologie / répartition / spectre d'hôte acquises au fur et à mesure des recherches.

Conclusions et Recommandations :

- L'exploitation des données se fera à trois niveaux emboités répondant à des questionnements présents ou futurs différents :
 - 1) un niveau local situé au niveau des parcellaires pour mieux comprendre la diffusion de la maladie
 - 2) une échelle intermédiaire (région, ensemble de sites ateliers) pour d'approcher la dynamique inter-localités
 - 3) le niveau européen permettant de prévoir des zones européennes à risque
- Les données produites par les services de l'Etat pourrait servir rapidement à :
 - 1) Modéliser la progression spatiotemporelle de la maladie,
 - 2) Ajuster des données de suivi de l'épidémie,
 - 3) Prédire l'expansion future, les zones à risque sur le continent
 - 4) Optimiser les plans de surveillance, en réduisant le nombre des zones à surveiller.
 - 5) Faire un état des lieux au temps 0,
 - 6) Faire une description des communautés d'insectes vecteurs efficaces en Corse
 - 7) Alimenter une bibliothèque de code-barres génétiques pour identifier les vecteurs
- Le moyen le plus efficace pour le stockage et le partage des données recueillies serait probablement de développer une base de données sécurisée, accessible via internet

Objectif 2 - Analyser les insectes connus pour être vecteurs pour identifier s'ils sont contaminées et aptes à transmettre la bactérie

Nous rappelons avant tout que ce n'est pas parce que *Xylella fastidiosa* est détectée dans le (pré)cibarium de l'insecte que celui-ci sera un vecteur efficace pour une plante donnée. Des tests de vécion devront être réalisés (cf. point 4 du présent objectif), dans des conditions confinées.

2.1. Avant-propos

2.1.1. Bilan des collectes effectuées lors de la mission

Des prélèvements d'insectes ont été effectués sur 19 sites en utilisant essentiellement du fauchage de plantes herbacées et arborées ([annexe 8](#))

1726 insectes ont été prélevés (cicadomorphes et fulgoromorphes). Sur ce total, **1142 appartiennent à des espèces considérées potentiellement vectrices de la bactérie**. Dont *Cicadella viridis* (Cicadellidae) qui a été l'espèce la plus récoltée avec 758 individus capturés. Cette cicadelle a été trouvée dans 6 des 19 sites prospectés, avec des populations parfois très importantes, deux points de récolte avec plus de 300 individus. La seconde espèce en quantité est *Aphrophora pectoralis* (Aphrophoridae) avec 335 insectes. Il s'agit du **premier signalement de cette espèce en Corse**, récoltée sur deux sites avec 334 individus pour l'un et un seul pour l'autre. Ensuite vient *Lepyronia coleoptrata* (Aphrophoridae) avec 42 individus récoltés sur 4 sites, dont 39 sur un seul. Les autres vecteurs potentiels récoltés sont beaucoup moins nombreux, 4 *Cicada orni* (Cicadidae), 2 *Aphrophora alni* et 1 *Neophileanus* sp. (Aphrophoridae). Par espèce, les densités de populations sont très variables en fonction du milieu exploré. **Sur les 11 espèces potentiellement vectrices de *X. fastidiosa*, identifiées comme présentes en Corse, six ont été récoltées lors de la mission.**

Deux points à souligner suite à cette collecte.

1) Le milieu de l'été n'est pas la meilleure période de l'année pour récolter les insectes recherchés, c'est par exemple une période d'estivation pour *Philaenus spumarius*, les conditions climatiques comme la sécheresse rendent les captures beaucoup plus difficiles, les insectes se réfugiant dans des abris souvent proches de cours d'eau.

Suite à cette mission, **des collectes futures seront donc nécessaires afin d'avoir une meilleure image des vecteurs possiblement porteurs de la bactérie, quelques suggestions sont développées dans l'objectif 3.**

2) Des espèces non encore reportées de Corse mais pouvant être vecteurs pourraient être découvertes au fur et à mesure des prospections (en témoigne *Aphrophora pectoralis*, capturé sur *Salix* par AC et JYR lors de la présente mission) ainsi, la liste présentée en [annexe 2](#) pourrait évoluer.

Une partie des insectes collectés servira au développement, par l'ANSES, d'une méthode officielle de détection de *Xylella fastidiosa* insecte par insecte ; une autre partie servira au développement par l'INRA d'une méthode à haut débit et à faible coût pour i) identifier à l'espèce un grand nombre d'échantillons et, dans le même temps, ii) détecter si les échantillons portent *Xylella fastidiosa* et de quelle souche il s'agit. Une fois mise en place la méthode de détection à haut débit sera transférée à l'ANSES. Des contacts réguliers seront maintenus entre ANSES et INRA afin de faire les meilleurs choix techniques et stratégiques pour fournir un outil efficace permettant le suivi de l'infection (première réunion prévue mi-septembre).

Conclusions

- Sur les 11 espèces potentiellement vectrices de *X. fastidiosa*, identifiées comme présentes en Corse, six ont été récoltées lors de la mission
- Une espèce à notre connaissance non encore signalée de Corse, a été récoltée pendant la mission
- Des collectes futures sont nécessaires afin d'avoir une meilleure idée des vecteurs possiblement porteurs de la bactérie (notamment *Philaenus spumarius*, en estivation durant la mission).

2.1.2. Etat de l'art sur les méthodes moléculaires utilisées pour la détection et l'identification des souches de Xylella fastidiosa dans des insectes vecteurs

Un état de l'art détaillé est présenté en [annexe 1](#).

Il est important de souligner qu'il existe

- i) **des méthodes de détection qui permettent de dire si oui ou non *Xylella fastidiosa* (quel que soit la sous-espèce/souche) est présente dans un insecte et**
- ii) **des méthodes de détection et caractérisation qui permettent de détecter la bactérie et de déterminer de quelle sous-espèce voire souche il s'agit.**

Actuellement les seules méthodes qui permettent de déterminer avec précision la souche d'appartenance et les possibles recombinants sont des méthodes basées sur le séquençage et l'analyse de fragments ciblés du génome de la bactérie (MLSA voire MLVA, annexe X)

Pour le moment aucune méthode qui permette d'identifier à la fois l'espèce d'insecte et la souche bactérienne n'a été proposée.

Les études actuelles n'ont été effectuées que sur un nombre faible d'insectes (< 200). **Etant donné les besoins requis pour les études épidémiologiques et les besoins en surveillance du territoire il est nécessaire de développer des méthodes fiables permettant du haut-débit. Un effort de recherche est nécessaire mais avec les avancées**

technologiques récentes (séquençage de nouvelle génération, qPCR dans des microvolumes), l'objectif pourrait être atteint sous 1 an environ.

On note également que ces méthodes pourraient être appliquées aux plantes avec quelques ajustements. De manière plus générale, ces méthodes permettraient d'acquérir des données de manière incomparable avec tout ce qui a été fait jusqu'à présent dans des enquêtes épidémiologiques en protection des plantes ou en surveillance du territoire.

2.1.3. Initiation d'une collaboration ANSES / INRA pour le développement des méthodes de diagnostic (identification et caractérisation)

Il est nécessaire d'engager rapidement un travail commun sur le développement et l'utilisation au quotidien de méthodes nouvelles de détection et de séquençage des bactéries dans les plantes et les insectes. Ces méthodes basées sur les Nouvelles Technologies de Séquençage (NTS) à plus haut débit et/ou en temps réel permettraient de faciliter la tâche de l'ANSES dans la détection de la bactérie dans les insectes mais aussi dans les plantes. Ce type de méthode permettrait ainsi de tester plus d'individus en même temps et de séquencer les gènes de caractérisation des lignées de bactéries pour les exemplaires positifs. **Une première réunion pour le partage de compétences et de méthodologies, est d'ores et déjà prévu en septembre. Le passage sur de tels outils pourrait être rapidement mis en place (1 an) moyennant un soutien au développement, à l'optimisation de ces méthodes nouvelles et au transfert vers les laboratoires impliqués.** Des laboratoires INRA, sont en veille technologique sur ces méthodes depuis plusieurs années, et ont récemment réalisés des tests très positifs de séquençage multi-génique haut débit. Il reste encore des points d'automatisation des PCR Realtime (Fluidigm), extractions à parfaire pour réellement parler de haut-débit et de routine. Les données massives ainsi produites pourraient d'une part servir à la surveillance du territoire et d'autre part alimenter les bases de données et les analyses épidémiologiques.

Afin de mettre en place ces méthodes il est nécessaire de s'appuyer sur un réseau de collaboration international afin de profiter des expertises développées ainsi que de bénéficier de témoins positifs pour tester la sensibilité des méthodes nouvellement développées. Ce réseau est en cours d'élaboration.

2.2. Prélèvements d'insectes susceptibles d'être vecteurs en vue du développement de la méthode par l'ANSES permettant de détecter la bactérie sur ces vecteurs

Dans un premier temps, le LSV s'oriente vers l'évaluation des méthodes suivantes: PCR en temps réel développée par Harper et al. (2010 erratum 2013), précédée d'une comparaison de trois de kits d'extraction (d'ADN) commerciaux : QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile), DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen), DNeasy® Plant mini kit (Qiagen) (Alexander H Purcell, comm. Pers., Rodrigo Almeida, comm. pers.).

La méthode complète devra être validée en inter-laboratoire en vue de son transfert à des laboratoires agréés.

Suivant l'état d'avancement des travaux prévus par l'INRA sur développement d'une méthode d'analyse à haut débit, une réorientation des travaux de méthodologie vers ces techniques innovantes pourra être envisagée par le LSV.

2.3. Prélèvements d'insectes susceptibles d'être vecteurs en vue du développement par l'INRA d'une méthode d'analyse à haut débit permettant de tester la présence de la bactérie sur un grand nombre d'insectes

Le travail devra être effectué en deux étapes : 1) analyse rapide des échantillons prélevés en Corse pour détecter la présence éventuelle de la bactérie. Si la bactérie est détectée, les gènes de ménage du typage MLST seront séquencés pour déterminer la sous-espèce/souche dont il s'agit ; 2) mise en place d'une méthode à haut débit permettant la détection de *Xylella fastidiosa* dans les vecteurs ainsi que l'identification de la sous-espèce / souche de bactérie concernée et celle du vecteur. Le point 1 est considéré comme un objectif de la présente mission. Le point 2 est un objectif de recherche à court terme (1 an, [Annexe 9](#)) qui pourrait améliorer la qualité des suivis épidémiologiques et la surveillance en santé des plantes mais dépasse le cadre de cette mission.

Les méthodes proposées tiennent compte des éléments exposés dans l'état de l'art sur les méthodes moléculaires utilisées pour la détection et l'identification des souches de *Xylella fastidiosa* dans des insectes vecteurs présenté en [annexe 1](#), ainsi que de notre expérience, des échanges que nous avons pu avoir avec différents chercheurs américains travaillant dans le domaine et des développements technologiques récents.

2.3.1. Analyse rapide et à moindre coût des échantillons collectés en Corse

Sur la moitié des vecteurs potentiels récoltés (l'autre moitié étant dédiée à la mise en place d'un test officiel par l'ANSES), nous proposons 1) de disséquer les cibarium/précibarium en enlevant les yeux et le maximum de chitine pour diminuer les inhibiteurs de PCR 2) extraire l'ADN de l'insecte et de la bactérie (si elle est présente) en utilisant le DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen), 3) d'effectuer une PCR classique avec deux couples d'amorces spécifiques permettant la détection de *Xylella* (gènes *gyrB* Hail et al., (2010) et un locus MLST Yuan et al., (2010)) (contrôle double pour éviter les faux négatifs). Nous inclurons dans ces tests des témoins positifs (insectes infectés par la bactérie, que des collègues américains de l'USDA nous ont fournis (R. Krugner USDA, CA) afin de vérifier que notre méthode de détection fonctionne. Si ce n'est pas le cas des ajustements seront effectués (qPCR, changement de marqueurs etc.). Nous amplifierons également le gène *COI* utilisé pour le barcode des insectes (Hebert et al., 2003) 4) Si la bactérie est détectée, nous amplifierons par PCR l'ensemble des loci du typage MLST plus celui de la *gyrB* et de *pilU* qui semblent informatifs d'après certains auteurs (cf. [annexe 1](#)). Il y a une très forte probabilité qu'aucun positif ne soit détecté sur les insectes prélevés en Corse : seuls les témoins devraient amplifier pour les gènes ciblant l'ADN de *Xylella*. C'est pourquoi nous

privilégierons un séquençage classique de type Sanger. Le recours à des méthodes de séquençage de nouvelle génération semble ici inapproprié (coût trop élevé). Les données générées (a minima pour le gène *COI* permettant l'identification des insectes) pourraient être les premières pierres d'une base de données sur les vecteurs potentiel de *X. fastidiosa* en Corse (et donc en Europe). Ces résultats devraient être disponibles fin septembre 2015.

2.3.2. Développements futurs proposés pour la détection à haut débit de *X. fastidiosa* dans les insectes vecteurs (nécessite la mise en place d'un projet de recherche – un an est a priori nécessaire)

Nous décrivons ici la méthode envisagée, depuis l'extraction d'ADN jusqu'à l'obtention de séquences pour plusieurs loci diagnostiques permettant d'identifier dans le même temps l'insecte ainsi que la souche de *Xylella fastidiosa* éventuellement portée (voire [l'annexe 10](#) pour une description illustrée). Il est possible que certains ajustements soient nécessaires au fur et à mesure de la mise en place. Le but est de mettre en place un protocole qui permette d'analyser un maximum d'insectes en un minimum de temps et ce, de manière fiable.

1) **l'extraction d'ADN** sera a priori effectuée avec le DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen) mais d'autres kits seront testés. **Le but est d'automatiser au maximum cette étape tout en gardant un rendement en ADN suffisant.** Ainsi des robots pourront être testés (deux sont actuellement disponibles à l'INRA ainsi qu'au LSV; e.g. Kingfisher – ThermoFisher scientific). Il est également important de **comparer les résultats obtenus lorsque l'ADN est extrait de l'insecte entier ou lorsque le cibarium est disséqué et la chitine et les yeux enlevés.** La dissection est un processus chronophage dont il faudrait pouvoir s'affranchir. **Analyser l'impact de la méthode de conservation des spécimens est également important** (impact de l'éthanol ? possibilité de laisser les pièges à glu à l'air libre pendant une dizaine de jours puis de les stocker au réfrigérateur sans dégradation de l'ADN ? etc.)

2) Nous envisageons la détection/caractérisation de *Xylella* grâce à deux méthodes que nous testerons. Selon les résultats, le protocole définitif pourra reposer sur un mélange des deux méthodes (avec ajustements possibles) ou l'une des deux méthodes (avec ajustements possibles)

i) une **méthode de qPCR haut débit dans des microvolumes suivie de la construction de courbes de fusion et d'un éventuel séquençage.** L'appareil envisagé est le BioMark HD – Fluidigm (disponible à l'INRA) qui permet jusqu'à 9216 réactions en 3-4H ie. 96 échantillons x 96 couples d'amorces (S. Marin pers. com.). Les sondes utilisées pourraient s'inspirer de celles de Brady et al., (2012) ([annexe 1](#)), ceci afin de pouvoir à la fois détecter et faire un premier diagnostic de la sous-espèce / souche transportée. L'intérêt ici est que certains des loci ciblés sont ceux du typage MLST et que le séquençage des produits de qPCR pourrait être envisagé. Il faudra toutefois vérifier l'information contenue dans les amplicons qui sont plus courts que ceux du typage initial. Selon le volume d'échantillons à traiter un appareil plus classique de qPCR pourrait suffire. Si les échantillons sont positifs l'amplification et le séquençage de l'ensemble des loci MLST sera réalisé suivant la méthode explicitée ci-dessous.

ii) une méthode qui consiste à amplifier l'ensemble des loci MLST + *pilU*, *nuoN* et *gyrB* ainsi que 2 marqueurs pour les insectes *COI* (barcode classique) et 1 marqueur nucléaire (en cas d'introgression mitochondriale) puis à les séquencer à haut débit. Il s'agit d'un protocole de PCR en 2 étapes qui permettrait d'amplifier et de séquencer (si l'amplification est positive) jusqu'à 1504 échantillons sur 12 gènes (séquençage haut débit Miseq paired-end 2*300 bp ; 20 millions de séquences obtenues, soit 1100X par loci). Le séquençage de multiple loci sur des insectes avec un haut degré de multiplexage a déjà été mise en place dans le laboratoire INRA concerné pour le besoin d'autres projets. Afin de limiter le nombre de PCR manuelles, de diminuer les volumes réactionnels, de s'affranchir de l'étape de dépôt sur gel et donc de diminuer le temps pour l'acquisition des résultats nous envisageons de transférer cette méthode sur une technologie de type Access array system – Fluidigm (disponible à l'INRA). Afin de permettre la détection de variants dans des suivis épidémiologique, le recours à un protocole qui permettrait l'acquisition rapide de données MLVA devra être envisagé.

3) A noter que ce type de protocole pourrait également être mis en place sur des échantillons de plantes avec une partie du travail dédié au traitement des inhibiteurs de PCR (e.g. tanins) qui peuvent générer de faux négatifs.

4) On mentionnera ici que grâce à la méthode en PCR 2 étapes, il est également possible d'envisager le séquençage de certains marqueurs (e.g. différentes régions du marqueur ARNr 16S, *gyrB*) avec des amores universelles pour les bactéries et les archées afin d'analyser le microbiote du cibarium des insectes vecteurs (e.g. Rogers et Backus (2014) ou le microbiote vasculaire des plantes saines/contaminées afin d'identifier le possible rôle de certains microorganismes dans la transmission de *Xylella*. Une approche de métagénomique pure (séquençage de la totalité de l'ADN ou de l'ARN des micro-organismes présents) est également envisageable ([perspective de recherche, annexe 9](#)).

5) enfin on notera qu'il est également possible d'identifier au moins en partie le régime alimentaire des insectes suceurs par le séquençage de gènes chloroplastiques (16S compris). Dans une récente étude, Rogers et Backus (2014) tentent de caractériser le microbiote d'*Homalodisca vitripennis* par séquençage au débit (Miseq) de 16S et obtiennent 10% de séquence pour les chloroplastes de la plante hôte. **Ce type d'expérimentation pourrait contribuer à améliorer nos connaissances sur les vecteurs qui sont somme toute parcellaires. En particulier ceci pourrait aider à l'identification des réseaux d'interactions potentielles entre plantes hôtes de la maladie et vecteurs potentiels (objectif 3).**

2.4. Stockage approprié des individus collectés et des ADN extraits de ces spécimens, pour de futures investigations par les équipes ANSES et INRA

La technique utilisée lors de la mission a été le fauchage (pour essayer d'obtenir un maximum d'insectes en un minimum de temps). La méthode de conservation a donc été l'Ethanol 75 comme décrit en [annexe 6](#) (qui présente les recommandations sur le stockage des échantillons). Les références des tubes ont été rentrées en base de données.

Les ADN une fois extraits seront conditionnés en tubes matrix marqués par des codes 2D (<https://www.matrixtechcorp.com/storage-systems/solutions.aspx?id=14>) qui permettent une bonne traçabilité tout en nécessitant un espace de stockage minimal. Les plaques seront stockées à -20°C (procédure validée dans le cadres du projet Européen FP7 QBoL (<http://www.qbol.org/en/qbol.htm>) qui visait au développement d'outils diagnostiques de type barcodes pour l'identification des organismes de quarantaine en Europe)

Conclusions et recommandations

- Les seules méthodes qui permettent de déterminer avec précision la sous-espèce et souche de *X. fastidiosa* et les possibles recombinants sont des méthodes basées sur le séquençage et l'analyse de fragments ciblés du génome de la bactérie (MLSA voire MLVA).
- Aucune méthode permettant d'identifier à la fois l'espèce d'insecte et la souche bactérienne n'a été proposée.
- Etant donnés les besoins pour les études épidémiologiques et la surveillance du territoire il est nécessaire de développer des méthodes fiables permettant du haut-débit. Un effort de recherche est nécessaire mais avec les avancées technologiques récentes l'objectif pourrait être atteint sous 1 an environ.
- Ce type d'approche pourrait également être mis en place pour les échantillons de plantes
- L'ANSES et l'INRA proposent de travailler de concert afin de mettre en place des outils pertinents et opérationnels rapidement pour la détection de *X. fastidiosa* dans les insectes vecteurs (ceci nécessite un effort de recherche, des pistes sont proposées).
- Grâce aux méthodes de séquençage à haut débit, il est possible d'envisager l'analyser du microbiote du cibarium des insectes vecteurs ou le microbiote vasculaire des plantes saines/contaminées afin d'identifier le possible rôle de certains microorganismes dans la transmission de *Xylella* (perspective de recherche).
- Il est également possible d'identifier au moins en partie le régime alimentaire des insectes suceurs ce qui pourrait contribuer à améliorer nos connaissances sur les vecteurs qui sont parcellaires (description des réseaux d'interactions potentielles entre plantes hôtes de la maladie et vecteurs potentiels (objectif 3).
- Les ADN devront être conditionnés dans des contenants permettent une bonne traçabilité tout en nécessitant un espace de stockage minimal (e.g. tubes matrix avec des codes 2D)

2.5. Initiation d'un travail scientifique en commun (ANSES, INRA) sur l'évaluation de l'aptitude à la transmission de la bactérie par les insectes vecteurs prélevés en zone délimitée ou identifiés au point 3/ et en fonction du point précédent

Les essais à mener concernant l'évaluation de l'aptitude des vecteurs potentiels à transmettre la bactérie doivent être réalisés dans des installations présentant un très haut niveau de confinement type NS3. Il est donc nécessaire dans un premier temps de recenser les laboratoires de recherche qui disposent de ce type d'installations et de connaître leurs disponibilités (e.g. ANSES, Angers).

L'expérimentation devrait porter sur les espèces végétales hôtes d'intérêt pour la Corse (olivier, amandier, pêcher, citrus, vigne, chênesverts, voire sur le platane omniprésent en zones non agricoles et espaces verts) **avec les différentes souches isolées en Corse (*X.f. subsp. multiplex 1 et 2*) et sur la souche CoDiRO italienne (*X.f. subsp. pauca*)**. Une collaboration avec le centre INRA de Corse et le conservatoire botanique national de Corse pourrait être envisagé.

La meilleure méthode pour tester la capacité de transmission de la maladie par un vecteur est de réaliser des expériences de transmission en milieu confiné, avec des vecteurs qui sont initialement non porteurs. Cette méthode permet d'estimer l'efficacité d'un vecteur donné à transmettre la bactérie. Ces expérimentations se basent sur une méthodologie bien établie :

- Un certain nombre de vecteurs (20-50 individus) sont placés, pendant une durée déterminée, dans une cage contenant une plante infectée par *Xylella* pour acquérir la bactérie.
- Un ou plusieurs de ces vecteurs sont ensuite enfermés dans une cage contenant une plante saine, pendant des durées variables préalablement déterminées.

Puis ces vecteurs sont tués et après un certain temps le nombre de plantes infestées est déterminé, ceci peut se faire par des tests moléculaires.

Il est à noter que des financements dédiés seront nécessaires.

Conclusions et recommandations

- On rappelle que ce n'est pas parce que *Xylella fastidiosa* est détectée dans le (pré)cibarium de l'insecte que celui-ci sera un vecteur efficace pour une plante donnée, des tests de vection sont nécessaires
- Ces tests devront être réalisés dans des installations présentant un très haut niveau de confinement type NS3 et nécessiteront un effort de recherche à moyen terme avec financements dédiés.

Objectif 3 - Acquérir une meilleure connaissance des vecteurs potentiels dans le cadre de recherches à moyen terme

3.1. Travail bibliographique de recherche de populations importantes d'insectes vecteurs potentiels sur plantes spécifiées en région Corse qui pourraient être source à l'avenir d'un développement épidémiologique exponentiel

3.1.1. Les vecteurs potentiels en Corse, qui sont-ils ; quel est notre niveau de connaissance sur chacun d'entre eux ?

Les vecteurs potentiels corses identifiés par leur régime alimentaire, i.e. Une prise de nourriture au niveau de la sève brute ou xylème, sont au nombre de 11 : *Ledra aurita*, *Cicadella viridis* (Cicadellidae), *Aphrophora alni*, *Aphrophora pectoralis* (signalé pendant la mission), *Lepyronia coleoptrata*, *Neophilaenus lineatus*, *Philaenus spumarius* (Aphrophoridae), *Cicada orni* (Cicadidae), *Cicadetta fangoana*, *Tibicina corsica corsica* et *Tibicina nigronervosa* (Tibicinidae) ([annexe 2](#)).

Les connaissances sur l'importance de ces espèces en Corse sont très lacunaires voire inexistantes à l'exception peut-être des cigales (Puissant and Sueur, 2001; Puissant, 2006). Tout est à faire pour ce qui concerne les Aphrophoridae et les Cicadellidae.

Aucun travail scientifique ne fait référence à la possibilité de vection de *Xylella fastidiosa* par les espèces citées ci-dessus à l'exception de *Philaenus spumarius*. Cette espèce d'origine paléarctique a été introduite en Amérique du nord où elle a été reconnue comme vectrice de la bactérie mais semble-t-il, sans causer de développement épidémique de la maladie (EFSA, 2015). En Italie, Saponari et al. (2014) ont mis en évidence que des individus de *Philaenus spumarius* récoltés dans ou à proximité de parcelles d'oliviers contaminé par *X. fastidiosa* subsp. *pauca* coDiRO pouvaient transmettre la maladie aux pervenches de Madagascar (*Catharanthus roseus*) mais pas aux oliviers (*Olea europaea*) (5 pervenches âgées de 2 mois testées, 7 oliviers âgés d'1 an testés, exposition de 8 à 10 insectes pendant 96h en conditions contrôlées puis incubation des plantes pendant 30 jours ; détection par PCR de *X.f.* subsp. *pauca* souche CoDiRO seulement sur 2 pervenches).

Lepyronia coleoptrata est citée sur *Carex*, *Ranunculus*, *Plantago*, *Polygonum*, *Vaccinium* ; *Tibicina nigronervosa* sur *Olea europaea*, *Quercus suber*, *Pinus* ; *Cicadella viridis* sur *Prunus*, *Salix* ; *Ledra aurita* sur *Quercus* ; *Aphrophora alni* sur *Salix* ; *Neophilaenus lineatus* sur *Carex* et *Philaenus spumarius* sur *Ranunculus*. Tous ces genres ou espèces sont repris dans la liste des végétaux spécifiés ou dans la liste des végétaux hôtes de *X. fastidiosa*. Mais **la liste des plantes-hôtes de chaque espèce n'étant pas exhaustive il est incertain d'établir un classement de ces insectes.**

Dans ces conditions il est difficile de hiérarchiser les conséquences épidémiologiques du développement des populations de ces vecteurs potentiels. Le seul risque assurément identifié est représenté par *Philaenus spumarius* si sa capacité vectrice de *X.f.* subsp. *multiplex* était démontrée.

3.1.2 Les vecteurs potentiels de *X. fastidiosa* présents en Corse : aspect général, où les trouver ?

L'identification spécifique fiable nécessite, dans la majorité des cas, des connaissances poussées en entomologie en général, et sur ces groupes en particulier. L'observation des génitalias des adultes mâles est souvent nécessaire.

Tout en encourageant la production de fiches d'identification plus complètes, nous proposons en [annexe 11](#) des fiches de présentation rapide des espèces (seule production restituée dans un si court laps de temps). On note que les données présentées concernant les vecteurs potentiels sont compilées à partir de populations présentes en Europe continentale ; seules les cigales sont bien renseignées quant à la situation en Corse.

Certains vecteurs [en particulier *Homalodisca* spp. (Hemiptera, Cicadellidae)] non encore présents en Europe, pourraient, s'ils étaient introduits, bouleverser l'épidémiologie de la maladie, comme cela a été le cas aux USA (hivernation à l'état adulte => survie d'individus infectés par la bactérie, combiné à un large spectre d'hôtes et une dispersion à large distance => explosion des foyers). Nous recommandons que ces espèces soient clairement intégrées à la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire. Pour mémoire on citera l'arrivée d'*Homalodisca vitripennis* en Polynésie française en 1999, probablement en provenance de Californie (Anonyme, 2002). Actuellement la directive 2000/29/CE réglemente 'les Cicadellidae (non européens) connus en tant que vecteurs de la maladie de Pierce (causée par *Xylella fastidiosa*) tels que : *Carnocephala fulgida* Nottingham, *Draecucephala minerva* Ball, *Graphocephala atropunctata* (Signoret)'. Il serait bon soit de citer nommément toutes les espèces de vecteurs, soit les genres, soit les 5 ou 6 plus importants vecteurs. Il est pour le moins surprenant qu'aucune espèce du genre *Homalodisca* ne soit citée étant donnée l'importance connue de ce genre pour la vection de *Xylella*.

3.1.3. De l'intérêt d'une base de données interfacées web contenant des informations sur chaque espèces ainsi que des barcodes pour leur identification moléculaire

L'identification morphologique des vecteurs potentiels est difficile. Afin de pouvoir effectuer des suivis de masse il est nécessaire de s'en affranchir. Depuis 2003 (Hebert et al., 2003) des initiatives se développent pour construire une base de données qui permettraient l'identification de tous les organismes grâce à un petit fragment de leur ADN. Pour les insectes il s'agit d'un fragment du gène mitochondrial COI codant pour la sous unité I de la cytochrome oxydase. Une base de données est par exemple en construction à l'INRA (<http://arthemisdb.supagro.inra.fr>)

L'idée est de rentrer en base de données l'ensemble des séquences générées pour ce fragment. Les **bases de données sont interfacées sur le web** et l'utilisateur peut soumettre une séquence qu'il a lui-même générée afin de la comparer à l'ensemble des séquences présentes dans la base. L'identification la plus probable lui est retornnée (en précisant le pourcentage de similarité de sa séquence avec celle qui est la plus proche dans la base ou en positionnant sa séquence dans un arbre phylogénétique contenant l'ensemble des séquences de la base). Si des informations biologiques / iconographiques ou autres sont disponibles dans la base, l'utilisateur peut se renseigner plus en profondeur sur l'espèce en sa présence.

La condition sine qua non d'une identification correcte est bien évidemment la compléction de la base de données et l'exactitude des informations stockées dans la base. Il est en effet indispensable que les séquences de référence soient rattachées sans ambiguïté à des spécimens qui ont été identifiés par des taxonomistes spécialistes des groupes.

Cette approche, si elle fonctionne bien pour la majorité des groupes, a cependant des limites. Par exemple, lorsque deux espèces possèdent la même mitochondrie du fait d'une hybridation passée, les séquences de COI sont identiques et ne permettent donc pas de d'identification. Pour parer à une telle éventualité un autre gène que COI (nucléaire cette fois-ci) est séquencé. Il est important de stocker dans ces bases de données des séquences de plusieurs individus de la même espèce en couvrant son aire de distribution : ainsi la diversité génétique de l'espèce est reflétée dans la base. Ce faisant il arrive que l'on découvre que sous un nom d'espèce se cachent en fait plusieurs clusters génétiques. Il faut alors séquencer un plus grand nombre de marqueurs afin de clarifier le statut de cette espèce (on peut supposer que ce soit le cas pour *Philaenus spumarius* étant donné son polymorphisme morphologique et son spectre d'hôte très large). Ces études font partie de projets de recherche plus poussés.

L'idée serait ici de **développer une telle base de données pour les vecteurs potentiels de *Xylella* en Corse** (voire sur le continent et en Europe, il serait bon d'y inclure les vecteurs considérés comme quarantaine). L'ensemble des informations se rapportant aux vecteurs pourrait y être consigné sous forme de fiches et un module d'identification en ligne permettrait l'assignation d'une séquence à une espèce.

Ainsi les masses de séquences générées lors des suivis épidémiologiques pourraient être comparées à la base afin de connaître l'état d'infectiosité des populations. Il serait évidemment pertinent que **cette base soit reliée à celle contenant l'ensemble des informations recommandées dans l'Objectif 1** pour le suivi épidémiologique et la prédiction des risques.

Conclusions et recommandations

- La biologie (en particulier les spectres d'hôte) des 11 espèces potentiellement vectrices en Corse est mal connue. Des travaux de recherche sont nécessaires pour améliorer nos connaissances
- En conséquence, il est difficile de hiérarchiser les conséquences épidémiologiques du développement des populations de ces vecteurs potentiels
- Leur identification nécessite des connaissances poussées en entomologie. Les génitalias mâles ont souvent besoin d'être observés ce qui pose problème pour l'identification des femelles.
- Un site web adossé à une base de données moléculaires construite sur des connaissances entomologiques solides et permettant l'identification des espèces à partir de leur séquence ADN serait profitable. Les données sur la biologie/répartition des espèces pourrait y être renseignées au fur et à mesure de l'avancée des connaissances
- Il n'est pas impossible que certaines espèces soient des complexes avec des entités présentant des spectres d'hôtes plus réduits et des capacités de vécion différente (e.g. *Philaenus spumarius*), ce qui souligne la nécessité de développer des recherches sur ces espèces.
- Nous recommandons que certaines espèces les plus nuisibles non présentes en Europe et impliquant des risques importants quant à la transmission de *Xylella fastidiosa* (e.g. *Homalodisca* spp., *Oncometopia* spp., *Dilobopterus* spp. et *Bucephalogonia* spp.) soient clairement intégrées à la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire.

3.2. Identification des réseaux d'interactions potentielles entre plantes hôtes de la maladie et vecteurs potentiels

Dans l'état actuel des connaissances sur la présence en Corse de *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, il semble **difficile de faire une analyse épidémiologique argumentée** avec les données collectées. Néanmoins, les premières informations recueillies par les services de l'Etat permettent d'ores-et-déjà de **proposer quelques hypothèses qui devront faire l'objet d'études subséquentes** (sur les vecteurs ou les plantes).

- 1) La contamination observée, uniquement sur des plants de *Polygala*, parfois plantés depuis plusieurs années, semble - pour le moment - suggérer plusieurs hypothèses quant à la biologie des vecteurs, qui semblent non compétents :
 - L'absence de transmission trans-ovarienne et trans-stadiale de *Xylella*, implique que les vecteurs doivent acquérir la maladie après chaque mue ; cette ré-acquisition est un événement extrêmement rare. L'absence de vecteurs ayant des adultes qui hivernent est peut-être important dans la dynamique de la maladie, qui ne peut pas se transmettre de plante à plante dès le début du printemps. Il **conviendra dans les régions sud de l'Europe, et plus précisément en Corse, de vérifier qu'aucune espèce de vecteur n'hiverne à l'état d'adultes.**

- Les localisations de ces plantations n'ont pas permis la rencontre avec des vecteurs compétents et donc une dispersion de la maladie en dehors du compartiment *Polygala*. Les vecteurs se déplacent peu (au plus quelques centaines de mètres, pour les cigales) et sont peu fréquents dans les zones de jardin où la plupart des plants contaminés ont été découverts. En conséquence le transfert est un probablement un événement rare. **Il est important de mieux connaître les capacités de déplacement des vecteurs potentiels.** Des études biologiques dès le printemps ainsi que des collectes et de tests moléculaires devraient permettre savoir si les vecteurs portent la maladie et si en conséquence, l'absence de vécion apparente vient de leur capacité de déplacement.
 - Les périodes de vécion possible par les vecteurs potentiels en Corse, sont courtes : uniquement la période de l'année où des adultes vecteurs sont présents dans la nature et s'alimentent sur des plantes différentes. Il s'agit en l'occurrence de la période Mai – Novembre, mais avec une période d'estivation pour certains d'entre eux et avant une période hivernale qui les éliminent. Les espèces de vecteurs potentiels présents en Corse sont fort mal connues, **des études biologiques simples décrivant leur cycle de biologie, les plantes d'alimentation et les plantes de développement, leurs ennemis naturels sont nécessaires** et devraient être mise en place rapidement.
 - Les vecteurs sont peu efficaces pour transmettre la maladie dans les conditions actuelles, peut-être à cause de la rareté relative des plants contaminés dans l'environnement. En Amérique du nord, *P. spumarius* est un vecteur peu efficace de la maladie, vue la prévalence actuelle de la maladie en Corse, cette espèce ne rencontre ni la densité de plantes infectées, ni le niveau de populations bactériennes suffisant pour diffuser *Xylella* dans les autres compartiments. Ajouté à sa faible capacité de dispersion, ceci empêche une dispersion hors compartiment *Polygala*. **Il serait pertinent de faire des tests en condition confinée et de vérifier la capacité de vécion des quelques vecteurs potentiels** présents en Corse.
- 2) La biologie et l'écologie de la maladie sont mal connues et méritent une attention particulière
- **Les plantes-hôtes de la maladie, pouvant servir de réservoir, doivent être rapidement identifiées** en cas de développement de la maladie et cette information doit être croisée avec les nouvelles connaissances à acquérir sur les plantes-hôtes et les plantes d'alimentation des vecteurs potentiels.
 - Les hivers rigoureux et les basses températures curent les plantes de la maladie, cependant nos connaissances sont pauvres sur les zones présentant des conditions climatiques favorables en Corse, et ce dans un contexte de réchauffement climatique. **Il conviendra donc de parfaire les prédictions données en Annexe 7,** en développant des projets de recherche intégrant une prospection échantillonnant de plus nombreux *Polygala* dans différentes régions de Corse, et **plus particulièrement dans la plaine orientale** encore très peu prospectée et importante économiquement.

- Il est important de garder à l'esprit que lorsque les vecteurs et le pathogène rencontrent des conditions favorables, la maladie peut se répandre rapidement à partir de sources d'inoculum indétectables car en trop faible quantité et trop rares dans les habitats. **Ses sources potentielles d'inoculum sont inconnues en Corse (plantes réservoirs, plantes asymptomatiques, habitats favorables)**. Dans le cas où la maladie viendrait à s'échapper du compartiment *Polygala*, **il convient de continuer à rechercher ses sources potentielles d'inoculum**, en multipliant les tests de détection sur les plantes adventices, rudérales ou de bord de zones humides et en changeant les méthodes d'investigation.
- La dispersion a peut-être eu lieu, mais rarement puisqu'à ce jour aucun test sur d'autres plantes ne s'est révélé positif. Cependant, on ne peut pas complètement exclure la possibilité que la maladie soit encore en phase insidieuse dans la nature car le nombre de collectes d'autres plantes reste encore limité. **Les tests cités ci-dessus permettraient d'apporter des éléments de réponse.**
- Une autre approche pourrait consister à **déterminer quelles sont les espèces de plantes qui pourraient constituer des réservoirs d'inoculum** potentiel dans le paysage corse de basse altitude. Plus particulièrement à proximité de cultures sensibles à la sous-espèce *multiplex*. Ceci pourrait être anticipé expérimentalement - en conditions confinées - mais ce travail est long, difficile et coûteux.

Cet ensemble d'hypothèses montre, si besoin en était, notre **méconnaissance actuelle de la biologie de la maladie dans son nouvel environnement et celles des vecteurs potentiels**. Elles impliquent de mettre en place, le plus rapidement possible, des études de biologie et des observations sur les plantes-hôtes et les plantes d'alimentation des vecteurs. Comme expliqué dans l'Objectif 2 l'outil moléculaire pourrait contribuer à l'éclaircissement des réseaux d'interaction par l'analyse des régimes alimentaires. La description par plusieurs observateurs de la présence de nombreux « crachats de coucou » sur les cistes au printemps incitent à étudier dès le prochain printemps ces larves de vecteurs potentiels qui semblent pulluler (ainsi que les cistes eux-mêmes pour rejeter l'hypothèse qu'ils soient porteurs asymptomatiques). **Ce suivi doit permettre d'acquérir des informations permettant de répondre à un certain nombre des hypothèses émises et à d'autres non encore formalisées.**

Parallèlement, il semble important de mesurer expérimentalement la capacité d'acquérir et de transmettre de plusieurs espèces de vecteurs potentiels communes en Corse mais aussi présentes sur le continent (*Cicadella viridis*, *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus* sp., *Aphrophora* sp., *Lepyronia coleoptrata*, *Cicada orni*). Ceci doit se faire en conditions confinées dans un laboratoire continental agréé, et demande donc de trouver un laboratoire et une équipe disposant des compétences et des installations adéquates, et acceptant de développer ce travail comme stipulé dans l'Objectif 2.

Afin de mieux comprendre la situation actuelle corse et d'anticiper une éventuelle contamination de plantes autres que *Polygala myrtifolia* et le genêt d'Espagne, il est important de pouvoir recouper les informations provenant des analyses conjuguée des capacités

d'acquisition de la bactérie par les vecteurs potentiels corses; des descriptions des cycles biologiques, des plantes hôtes et des plantes d'alimentation; des tests moléculaires sur les vecteurs collectés lors de la mission et ceux qui seront collectés par le réseau qui doit être mis en place (cf. 3.3).

Il est aussi important de débuter les études permettant de comparer et de tester les différentes méthodes de suivi de la maladie dans les plantes et dans les insectes vecteurs potentiels de façon à disposer de ces outils rapidement si par hasard la maladie se développait où qu'une autre souche apparaisse en France.

Conclusions et recommandations

- Il est nécessaire d'acquérir plus de connaissances sur la biologie et l'écologie des vecteurs potentiels en Corse : plantes-hôtes, plantes d'alimentation, capacité de dispersion, cycle biologique, ennemis naturels.
- Il serait pertinent de commencer rapidement des tests en condition confinée et de vérifier la capacité de vécion des quelques vecteurs potentiels présents en Corse.
- De même, mais cette fois-ci côté plante, il apparaît nécessaire d'accroître nos connaissances sur les plantes-hôtes de la maladie, pouvant servir de réservoir ; celles pouvant héberger la bactérie de manière asymptomatique.
- Continuer la recherche de plantes, différentes des *Polygala*, pouvant héberger la maladie
- Déterminer de manière expérimentale quelles sont les espèces de plantes cultivées et d'intérêt patrimonial (*Polygala*) qui pourraient constituer des réservoirs d'inoculum.

3.3. Avis sur la mise en place d'une surveillance exhaustive en Corse, voire en France, du groupe cigales, cicadelles, cercopes et aphrophores.

Recommandations et propositions de mise en œuvre pour un tel dispositif (collectes d'insectes à réaliser à grande échelle et dans la durée, par différentes méthodes).

Afin de contribuer à élucider les origines des contaminations (plants atteints liés à l'origine ou aux méthodes de production, contaminations pendant transports, contaminations sur place par vecteurs déplacés avec végétaux, vecteurs en place dans l'environnement) le concordance des souches *Xf*/ plantes hôtes ...) il est recommandé dans un premier temps de réaliser des prélèvements de vecteurs potentiels (et leur identification) sur le territoire Corse en vue de réaliser dans les meilleurs délais des analyses de détection de *X. fastidiosa* selon les méthodes évoquées aux points 2.1 et 2.2.

La répartition de ces groupes de ravageurs étant très peu connue, il y a à priori un grand intérêt à mettre une surveillance généralisée en place et à tracer la présence et répartition de ces espèces.

3.3.1. Intérêts d'une surveillance sur l'ensemble du territoire de ces organismes dans le cadre du dispositif général d'épidémio-surveillance :

Parmi la liste des insectes vecteurs potentiels de *X. fastidiosa*, seules quelques-unes des 52 espèces répertoriées comme présentes en France ont une importance agronomique : trois Aphrophoridae : *Aphrophora alni*, *Aphrophora salicina*, *Philaenus spumarius* ; deux Cicadellidae, *Cicadella viridis* et *Graphocephala fennahi* ; dans une moindre mesure un Cercopidae, *Cercopis vulnerata*. Aucune cigale n'est retenue comme ayant vraiment une importance agronomique. Cependant, la transmission de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* par des cigales a été démontrée expérimentalement sur caféier au Brésil (Paião et al., 2002) et sur vigne en Californie (Krell et al., 2007). De ce fait, étant données les populations importantes de cigales et leur large spectre d'hôte, leur implication mériterait d'être éclaircie en Europe (Stanganelli et al., 2015).

Les cycles de vie de ces vecteurs sont assez comparables (voir [Annexe 11](#)). L'œuf correspond au stade de diapause hivernale (aucune de ces espèces ne semblent hiverner à l'état adulte, mais ceci mériterait confirmation pour les régions les plus chaudes d'Europe). L'éclosion a lieu au printemps. Les adultes apparaissent au début de l'été et sont présents jusqu'au début du mois de novembre pour certaines espèces, s'accouplent et pondent. Dans les régions les plus chaudes de l'Europe dont la Corse, *P. spumarius* semble avoir une période d'estivation à l'état adulte (Yurtsever, 2000), il disparaît presque complètement pendant les mois de juillet et août, sauf en altitude (Bonfils and Della Giustina, 1978). En général, les aphrophores et *Graphocephala fennahi* n'ont qu'une génération par an. Néanmoins Drosopoulos et Asche (1991) suggèrent que *P. spumarius* est partiellement bivoltine dans certaines régions de Grèce dont l'altitude est inférieure à 1000 m (ceci mériterait d'être vérifié en Corse). Par contre il peut y avoir jusqu'à trois générations annuelles pour *C. viridis*.

L'importance économique de ces espèces est toute relative.

Chez *A. alni*, sur aulne, frêne, peuplier, saule, les larves causent peu de dégâts directs mais la prise de nourriture des jeunes adultes peut produire des callosités en anneau caractéristiques et ils affaiblissent les jeunes pousses.

Les dégâts provoqués par *A. salicina* peuvent être très importants sur saule et peuplier mais seulement en cas de pulllement car ils réduisent la vigueur des plantes.

Philaeus spumarius ne provoque pas vraiment de dégâts directs mais il peut être vecteur de maladies.

Cercopis vulnerata, reste un ravageur mineur, les adultes sont connus pour provoquer des dégâts sur la face supérieure du feuillage.

En Europe, *Graphocephala fennahi*, ne provoque pas vraiment de dégâts directs mais les blessures de ponte sur les bourgeons floraux sont responsables de la pénétration du 'bud blast' due à *Pycnostysanus azalae* (Ascomycetes) sur rhododendrons cultivés.

Cicadella viridis n'est identifiée que comme un ravageur mineur sur vigne et sur jeunes arbres fruitiers (pommier, poirier, pêcher, prunier).

Les dégâts pouvant être provoqués par des organismes transmis par ces insectes sont notamment plus importants. Trois d'entre eux sont impliqués dans la transmission de l'agent de la prolifération du pommier (*Candidatus Phytoplasma mali*) : *Aphrophora alni*, *Lepyronia coleoptrata* et *Philaenus spumarius*.

Philaenus spumarius est donné comme vecteur possible de cinq autres maladies : *Xylella fastidiosa*, le phytoplasme du jaunissement du pêcher (peach yellows), *Botryosphaeria* sp. agent de la Gombose du pêcher en Amérique du Nord, et les phytoplasmes responsables du rabougrissement des *Rubus* ou du Stolbur de la tomate en Europe.

Ces informations restent encore incomplètes ; les 52 espèces vectrices potentielles connues devront faire l'objet d'une recherche bibliographique la plus exhaustive possible

3.3.2. Propositions de dispositif

Le dispositif proposé permet de réaliser un inventaire des espèces d'insectes potentiellement vectrices de la bactérie, de mieux connaître leur biologie et leur phénologie, et de contrôler leur état d'infectiosité. Il devrait également permettre de fournir du matériel biologique pour élaborer des méthodes de détection de *X. fastidiosa*. Il s'applique sur les secteurs géographiques concernés par les cultures ou plantations des espèces végétales spécifiées comme hôtes de la bactérie.

Toute la France métropolitaine est concernée. Le positionnement des pièges au sein du réseau national d'épidémio-surveillance doit être adapté à l'importance des espèces végétales potentiellement sensibles dans les régions. Un renforcement spécifique du réseau est à prévoir en Corse ainsi que sur l'arc méditerranéen, voire au niveau des îles de la façade atlantique aux climats subméditerranéens (îles de Ré, Oléron, Noirmoutier,...), les conditions climatiques étant plus proches des régions déjà contaminées en Italie et en Corse.

La construction de ce réseau pourrait opportunément s'intégrer aux réseaux d'épidémiologie et de surveillance de la DGAL préexistants comme les réseaux SBT, du DSF, des différents plans de contrôle, etc.

De nombreux acteurs pourraient être impliqués : des structures institutionnelles : SRAL, DSF, ONF, FREDON, des instituts techniques comme le CTIFL en arboriculture, l'ASTREDHOR pour les productions horticoles, les organisations professionnelles, Chambres d'agriculture, voire les services d'entretien des espaces verts de collectivités territoriales.

3.3.2.1. Techniques de piégeage

Le dispositif repose essentiellement sur l'utilisation de pièges chromo-attractifs jaunes mais il bénéficierait à être complété par le fauchage ou le battage. Une attention particulière devra être portée à la capture des cigales qui sont parfois difficiles à piéger (cf. Objectif 2. Du présent rapport).

Les pièges utilisés mesurent 25x40cm, ils sont englués sur les 2 faces et la collecte s'effectue donc sur les 2 faces (e.g.

http://commerce.sage.com/BIOBEST/Famille/ECOM_CAT/54.aspx

Chaque piège est suspendu au niveau de la végétation. La hauteur du piège dépendra de la hauteur du couvert végétal, de 0,50 m du sol pour des strates basses à 1,50 m en verger par exemple. Les pièges sont relevés et changés au maximum tous les 7-10 jours (à adapter en fonction du taux de piégeage, de la vitesse de recouvrement de la plaque et des tests de biologie moléculaire menés pour déterminer si la qualité de l'ADN des vecteurs et de la bactérie sont encore suffisants pour assurer une bonne détection (cf. Objectif 2)).

3.3.2.2. Cultures et filières concernées

Pour les filières arboriculture et viticulture, les cultures qui semblent pertinentes à suivre sont : Olivier, Citrus (Clémentinier, Pomelos, Oranger, Citronnier, Cédrat), Amandier, Pêcher, Prunier, Abricotier et Figuier.

Couple régions / espèces végétales cultures pérennes pour le suivi des vecteurs de XF									
Régions	Vigne	Olivier	Citrus	Amandier	Pêcher	Prunier	Abricotier	Cerisier	Figuier
Corse*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PACA*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Languedoc Roussillon*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Rhône Alpes	X	X			X	X	X	X	
Midi Pyrénées	X				X	X	X	X	
Aquitaine	X					X			
Bourgogne	X								
Alsace	X					X			
Lorraine						X			
Champagne	X								
Centre	X							X	
Pays de la Loire	X								
Poitou Charente	X								

* régions considérées comme méditerranéenne pour cette étude

Dans l'attente du développement des capacités analytiques des laboratoires, une préconisation de 10 à 30 pièges par espèce végétale semble un minimum selon l'importance de chaque culture au sein de la région.

Pour les zones forestières, le même protocole qu'en arboriculture pourrait être mis en place pour les espèces des genres *Quercus*, *Acer*, et *Fraxinus*, en limitant le piégeage à la Corse en attendant la mise en place des piégeages de masse.

Pour les pépinières et zones non agricoles espaces verts, 4 pièges pourraient par exemple être posés dans les régions de large présence des espèces (2 pièges /espèce végétale en pépinières de ligneux, 2 pièges / espèce végétale en espaces verts) en couvrant et en se limitant de préférence aux 10 espèces suivantes :

-**Laurier rose** (*Nerium oleander*): Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA), Languedoc-Roussillon (LR), Rhône-Alpes (RA), Corse (Co)

- **Citrus**: PACA, LR, RA, Co

- **Romarin** (*Rosmarinus officinalis*) : PACA, LR, RA, Co

- **Chênes** (*Quercus* sp.) : toutes régions de France

- **Oliviers** (*Olea*) : PACA, LR, RA, Midi-Pyrénées (MP), Aquitaine (AQ) et Co

- **Platanes** : toutes régions de France

- **Genêt d'Espagne** (*Spartium junceum*) : PACA, LR, RA, Co

- **Polygales (Polygala) ornementales** : PACA, LR, RA, MP, AQ, Poitou-Charentes (PC), Pays-de-la-Loire (PL), Bretagne (BRE), Normandie (NO) et Co

- **Mûriers** (*Morus* sp.) : Toutes régions de France

- **Érable** (*Acer* sp.) : Toutes régions de France

Les pièges devraient si possible être positionnés au sein des parcelles cultivées en pépinières ou dans les plantations monospécifiques si possible et dans des sites plantés en espaces verts :

En fonction de la spécialisation des établissements, les espèces hôtes telles que **Micocoulier**, **Lagerstroemia**, **Liquidambar**, **Liriodendron**, **Gingko**, **Prunus d'ornement**, **Frêne**, **Cornouiller**, **Magnolia**...peuvent être sélectivement ciblées et choisies pour suivis dans les régions

3.3.2.3. Répartition des piégeages sur l'année

En zone septentrionale : Au printemps : d'avril à juin. Fin d'été/Automne : de mi-août à fin septembre

En zone méditerranéenne : Au printemps : de mars à juin. En Automne : d'octobre à fin novembre

3.3.2.4. Positionnement des pièges

Les pièges doivent être positionnés dans la parcelle à 15 à 20m de la bordure. Tous les environnements générant de l'ombre, de l'humidité, sont à privilégier afin de maximiser l'efficacité des piégeages des vecteurs potentiels. En cas de capture de l'un de ces vecteurs on pourra envisager un échantillonnage dans l'environnement immédiat de la parcelle suivie (bois, haies, champs,...). Une méthode instantanée : fauchage/battage, utilisation d'un D-Vac, pourra être utilisée.

3.3.2.5. Identification des insectes collectés

Les insectes récoltés pourraient dans un premier temps être envoyés au laboratoire national de référence en entomologie (LNR) (Anses, LSV de Montpellier). Mais la probable augmentation des analyses à réaliser, nécessitera qu'un réseau de laboratoires agréés soit mis en place par le LNR. En préalable des formations à l'identification des insectes vecteurs potentiels sont réalisables à l'attention des acteurs de terrain et des laboratoires candidats, des méthodes d'identification officielles seront à produire. Ces méthodes devront être morphologiques mais surtout moléculaires afin de s'affranchir un maximum de la nécessité d'un travail morphologique fastidieux (cf. 3.1) en particulier sur des insectes piégés à la glu (voir 2.2.2.) et à haut débit, afin d'assurer un suivi efficace. Le temps nécessaire à la mise en place de telles méthodes et d'une base de données pour l'identification des vecteurs potentiels et d'un tel réseau ne pourra pas être inférieur à une année.

Contraint par les limites actuelles des capacités d'identification, le dispositif de suivi peut se décliner en trois niveaux :

- Suivi d'un nombre restreint de pièges sur tout le territoire qui permettra d'établir un premier inventaire des vecteurs potentiels. La capacité du LNR (LSV entomologie) peut être estimée à 2000 analyses, première phase de la mise en place du réseau.
- Piégeage de masse avec techniques moléculaires permettant d'identifier la bactérie dans les insectes. Cette deuxième phase de la mise en place du réseau est dépendante de la production des méthodes d'analyse par l'INRA et l'ANSES et de leur délégation à des laboratoires agréés.
- En cas de résultat positif à la présence de la bactérie lors du piégeage de masse, piégeage exhaustif sur ou dans l'environnement des parcelles concernées (battage/fauchage/piège à succion, barber)

Conclusions et Recommandations :

- La répartition des vecteurs étant très peu connue, il y a un intérêt à mettre une surveillance généralisée en place et à tracer la présence et répartition de ces espèces.
- Seules quelques-unes des 52 espèces répertoriées comme présentes en France ont une importance agronomique.
- Aucune cigale n'est retenue mais la transmission de *X. fastidiosa* ssp *pauca* par des cigales a été démontrée expérimentalement sur caféier au Brésil et sur vigne en Californie. Etant données les populations importantes de cigales et leur large spectre d'hôte, leur implication mériterait d'être éclaircie en Europe
- Un dispositif est proposé pour réaliser un inventaire et un suivi des espèces d'insectes potentiellement vectrices de la bactérie, de mieux connaître leur biologie et leur phénologie, et de contrôler leur état d'infectiosité, ce, sur l'ensemble du territoire.
- La mise en place de ce dispositif nécessite la construction d'un réseau qui pourrait opportunément s'intégrer aux réseaux d'épidémio-surveillance de la DGAL préexistants comme les réseaux SBT, du DSF, des différents plans de contrôle, etc.
- De nombreux acteurs pourraient être impliqués : des structures institutionnelles, des instituts techniques, les organisations professionnelles, chambres d'agriculture, voire les services d'entretien des espaces verts de collectivités territoriales.
- Le dispositif précise les techniques de piégeages qui pourraient être utilisées, les cultures et filières concernées, la répartition des piégeages et leur positionnement. Ce dispositif mérite néanmoins d'être discuté.

Objectif 4 - Déterminer, au regard de la situation locale, s'il est pertinent de prendre en compte certains facteurs de risques spécifiques en vue de prévenir la diffusion de la maladie

4.1. Initiation d'une analyse de risques liés aux principaux flux de végétaux de la Corse, vers la France métropolitaine ou autres pays, et des risques qui pourraient y être associés

4.1.1. Principales productions corses sensibles à *Xylella fastidiosa* et répartition géographique.

L'importance surfacique et économique des principales productions sensibles en Corse (vigne, olivier, pêcher, prunier, abricotier, cerisier, amandier, *Citrus*, chênesverts et chêneslièges) est précisée dans les [Tableaux 1 et 2](#) et la figure 2).

La surface agricole utilisée par les exploitations en Corse couvrait 169 000 ha en 2013 répartis en 2810 exploitations (chiffres 2010) dont à peu près le tiers en Corse-du-Sud (996 exploitations) et les 2/3 en Haute-Corse (1814 exploitations). Les productions végétales de l'île représentent 79 % des productions agricoles (d'une valeur totale de 227 millions d'euros). **Les productions végétales sont largement dominées par la vigne pour 51 % de la valeur (92 millions d'euros), suivies des productions fruitières pour 31 % (55 millions d'euros) dont certaines sont exposées à un véritable risque lié à *Xylella fastidiosa*.**

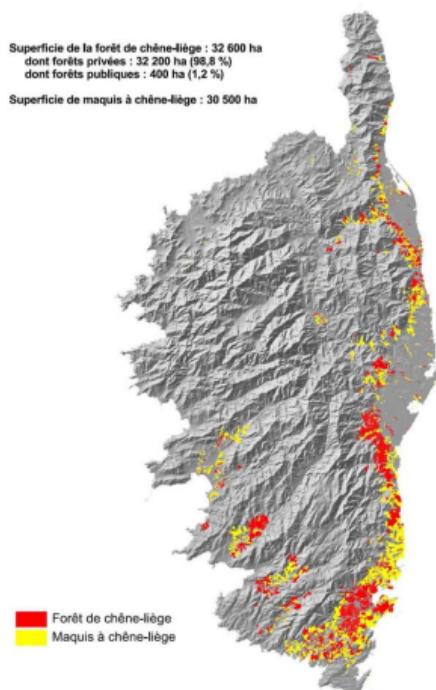
Tableau 1 Principales productions végétales corses (chiffres 2013) sensibles à *Xylella fastidiosa*

Principales productions végétales	Nombre de producteurs	Surfaces (en ha)	Quantités produites (en tonnes) sauf vigne (en hl)	Observations
Clémentiniers	128	1682	25438	Quasi-totalité de la production nationale (99,8%), pas d'exportation, sensible aux souches <i>X.f. subsp. pauca, fastidiosa</i>
Pomelos	36	142	3854	Production en hausse de 26% par rapport à 2012, 4% de la production exportée, sensible aux souches de <i>X.f. subsp. pauca, fastidiosa</i>
Pêchers		189	3124	En régression, sensible aux souches de <i>X.f. subsp. multiplex et fastidiosa</i>
Nectariniers		70	1250	En régression, sensible aux souches de <i>X.f. subsp. multiplex et fastidiosa</i>
Pruniers bouche + pruneau	30 adhérents à l'Association des fruits d'été	28	559	sensible aux souches de <i>X.f. subsp. pauca, multiplex et fastidiosa</i>
Abricotiers		41	610	Sensible aux souches de <i>X.f. subsp. multiplex</i>
Cerisiers		11	108	En augmentation, sensible aux souches de <i>X.f. subsp. pauca, multiplex et fastidiosa</i>
Amandiers	57	305	98	En régression mais 1 ^{ère} région productrice avec 36 % production nationale ; sensible aux souches de <i>X.f. subsp. pauca, multiplex et fastidiosa</i>
Oliviers	178	2110	2625	En progression, sensible aux souches de <i>X.f. subsp. pauca et multiplex</i>
Vigne AOC	260	2710	110554	14,7% blanc, 54,6 % rosé, 30,7 % rouge ; sensible aux souches de <i>X.f. subsp. multiplex</i>
Vigne IGP		2702	238513	8,7% blanc, 72,2 % rosé, 19,1 % rouge idem
Vigne sans IG		368	23498	44,5% blanc, 55,5 % rouge et rosé idem

Tableau 2 et Figure 2, Importance des chênes pour la Corse

Superficies	Chênes verts	Chênes liège	Observations
Superficie totale	66 500 ha	32 600 ha	Chênes verts surtout vendus comme bois de chauffage, se retrouve dans tous les types de sols, de la mer à 1200 m d'altitude; chênes liège vendus pour la production de bouchons ou de granulats de liège.
Dont forêts privées	54 300 ha	32 200 ha	
Dont forêts publiques	12 200 ha	400 ha	
Superficie du maquis à chênes	56 700 ha	30 500ha	Subéraies de type forestier et de type pastoral. Le genre <i>Quercus</i> est sensible aux souches de X.f. subsp. <i>multiplex</i>

Aire de répartition

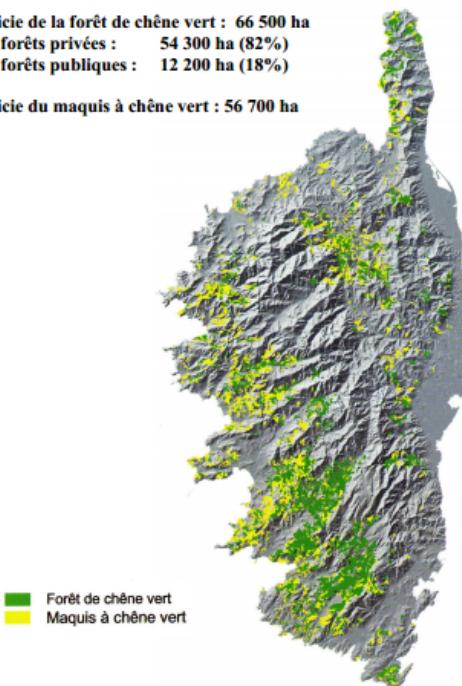


Source : 3^{me} inventaire INF, 2006

Aire de répartition

Superficie de la forêt de chêne vert : 66 500 ha
Dont forêts privées : 54 300 ha (82%)
Dont forêts publiques : 12 200 ha (18%)

Superficie du maquis à chêne vert : 56 700 ha



Aire de répartition des formations à chêne vert dominant en Corse
© Inventaire Forestier National 2003

Hormis les productions agricoles, les plantations forestières de chênesverts (*Quercus ilex* L.) et de chênes lièges (*Quercus suber* L.) revêtent une importance majeure tant par leurs fonctions écologiques et pour leur économie ([Tableau 2 et Figure 2](#)).

Comme dans toute la zone méditerranéenne, les villes et villages de Corse sont largement plantés d'espèces ornementales sensibles telles que le laurier rose (très sensible à la souche italienne de *X.f. subsp. pauca* et sensible à *X.f. subsp. sandyi*), le romarin et autres espèces arborées peuplant les parcs et jardins (platane, micocoulier, érable, etc.), ainsi que le polygale à feuille de myrte aujourd’hui atteint par la bactériose dans toute la partie sud de l’île.

4.1.2. Flux de la Corse vers la métropole et autres pays UE ou tiers

4.1.2.1 : La clémentine de Corse

Situation et contexte de la production

Découverte il y a plus de cent ans par le père Clément dans une plantation de mandariniers issus de semis située près d’Oran en Algérie, sa première description eut lieu en 1902 dans la revue horticole française par le professeur Trabut de la société horticole d’Alger. Introduite pour la première fois en Corse en 1925 à Figaretto sur la plaine orientale de l’île, le nom de ‘clémentine’ lui est attribué en 1929 en l’honneur de son découvreur.

En 2002, les chercheurs du centre INRA de Corse montrent que la clémentine *Citrus x clementina* résulte d’un croisement naturel entre la mandarine commune *Citrus deliciosa* et une orange douce *Citrus sinensis*. **Plantée massivement depuis la moitié des années soixante, la clémentine de Corse obtient un signe officiel de qualité : une indication géographique protégée (IGP) en 2007.** Cet IGP certifie des qualités dues au terroir de la région de production soumis à des conditions édapho-climatiques particulières (sol acide, pluviométrie et hygrométrie élevée, hiver doux) ainsi que des savoir-faire spécifiques des acteurs de la filière avec pour résultat une qualité singulière des clémentines, comme les critères d’apparence (couleur, calibre, ‘cul vert’) et de goût des fruits (goût équilibré sucre-acide, richesse en jus).

La méthode de production et d’obtention des fruits, bien codifiée par le règlement ‘clémentine corse’ (CE n° 2081/92 du conseil, prévoit l’ensemble des façons culturales dont certaines peuvent présenter une interaction possible avec la gestion des aspects phytosanitaires dans leur ensemble, et de la bactériose *Xylella fastidiosa* en particulier.

La gestion agronomique par ‘bloc fruitier’ géré de façon uniforme et indépendante des autres blocs fruitiers de l’exploitation (périodes d’intervention pour les façons culturales, protection phytosanitaire, taille, récolte...), de même que la culture en situation insulaire induisant un relatif isolement des autres grandes zones de production continentales, permet d’assurer un surplus de protection des vergers de clémentiniers par rapport à certaines maladies et favorise une meilleure maîtrise des organismes nuisibles.

En revanche, la récolte manuelle des fruits, effectuée avec une ou deux feuilles attachées au pédoncule du fruit, et servant comme indicateur de fraîcheur et de témoin de qualité des fruits, pourrait contribuer à la diffusion de certains organismes nuisibles présents dans les tissus foliaires en les faisant passer du champ à l’étal de commercialisation final.

Exportée à 90% de sa production vers la France métropolitaine (autour de 20 000 tonnes par an), la filière clémentine de Corse IGP constitue la seconde activité agricole de l'île après l'activité viticole. **L'importance économique du commerce des clémentines peut expliquer et justifier les préoccupations professionnelles vis-à-vis des risques potentiels liés à *X. fastidiosa*.**

Outre que les inquiétudes résultent d'une éventuelle introduction de la bactérie *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* en provenance des pays contaminés, les professionnels souhaitent être assurés que les risques d'éventuelles contaminations à partir des deux souches de la sous espèce *X.f.* subsp. *multiplex* détectées en Corse sur *Polygala myrtifolia* sont nuls via le commerce des fruits vers le continent.

Le commerce de la clémentine de Corse vers la France métropolitaine ou les pays de l'U.E. et le risque de propagation actuel de Xylella fastidiosa

Les zones de production de clémentines font actuellement l'objet de nombreux suivis en culture et d'une surveillance sanitaire attentive des vergers dans le cadre du réseau national d'épidémi-o-surveillance. En l'état actuel de la surveillance et des données relatées dans les bulletins de santé des végétaux 'agrumes', **aucune observation ne laisse penser à la présence de symptômes douteux ou en tous cas visibles pour inquiéter les techniciens et déclencher des séries d'analyses visant à lever toutes suspicion de présence de la bactérie *Xylella fastidiosa*.** Il faut noter que les vergers de clémentiniers se situent dans la plaine orientale de la Corse, donc à distance notable des foyers de *Xylella fastidiosa* identifiés dans la région sud et sud-ouest de l'île.

Par ailleurs, les données d'analyse de risques qui nous sont fournies par l'EFSA (2015) et les publications scientifiques relatives à *Xf.* subsp. *pauca* sur *Citrus* nous permettent de mettre en exergue les points suivants :

- Aucune donnée n'a été générée, ni n'est disponible sur la bactériose à *Xylella fastidiosa* sur clémentinier. Compte tenu des génomes différents des espèces de *Citrus* qui ne manquent pas d'induire des différences notables entre les fonctions biologiques, les processus biologiques et les composants cellulaires (Gmitter Jr et al., 2012) en général, et plus particulièrement sur les mécanismes moléculaires qui régulent les interactions citrus-*Xylella fastidiosa*, le fait qu'aucune étude sur *Xf.* ne concerne le clémentinier est plutôt rassurant. Compte tenu de l'importance des cultures de clémentinier dans le monde, il est légitime de penser que l'existence d'une sensibilité avérée et répartie de *X. fastidiosa* sur cette espèce de citrus aurait fatalement induit des signalements et études, à l'image de celles réalisées sur les autres espèces de citrus sensibles à la bactériose.

- Les études qui fondent les analyses de l'EFSA (2015) sa rapportant aux citrus, concernent essentiellement l'oranger (*Citrus sinensis*) et le citronnier (*Citrus limon*), puis, dans une moindre proportion, diverses autres espèces telles que *C. benghalensis*, *C. echinatus*,

C. medica, *C. paradisi* et hybrides d'oranger croisé avec *Citrus reticulata*, *Poncirus trifoliata*, *Citrus paradisi*.

Les études étant conduites pour la plupart dans les pays d'Amérique latine (Brésil, Argentine, Costa Rica) et du Nord (USA), les sous espèces étudiées sur citrus sont respectivement *X.f. subsp. pauca*, dont la souche coDiRO sévit en Italie, principalement sur olivier, puis plus largement sur une quinzaine d'espèces végétales, et *X.f. subsp. fastidiosa* aux USA qui attaque entre autres la vigne et la luzerne.

Sur citrus (mandarinier, oranger) reconnus hôtes de *X. fastidiosa*, de grandes différences de niveaux de sensibilité, tolérance ou résistance ont été décrites (de Souza et al., 2007; Della Coletta-Filho et al., 2007; de Souza et al., 2009). Des mécanismes actifs de défense induits par toute une batterie de gènes révèlent une réponse anti-*Xylella* multifactorielle durant les différentes phases de l'infection bactérienne de la plante.

Niza et al., (in press) ont étudié au Brésil les réponses d'orangers sensibles, de mandariniers résistants et de leurs hybrides aux processus d'infection de *X. fastidiosa*. Ils ont pu montrer une augmentation des populations bactériennes et une progression du mouvement de la bactérie bien supérieure chez les citrus sensibles. Ainsi, *X. fastidiosa* reste confinée au xylème primaire chez les espèces et cultivars résistants, et s'étend au xylème secondaire chez les sensibles. Dès les premiers stades de la colonisation par le pathogène, une induction de la lignification survient très tôt pour former une barrière physique empêchant la colonisation bactérienne. Il n'est pas douteux que les connaissances des génomes différents de la clémentine (haploïde) et de l'oranger (diploïde) et des génomes euploïdes de diverses espèces de citrus, mise à la disposition de la recherche, permettront la mise en œuvre d'études d'intérêts, dont celles incluant la connaissance des mécanismes de résistance à *X. fastidiosa* et leur expression en interaction avec les stress de nature abiotique.

L'extrapolation des connaissances du comportement des couples citrus-*Xylella* ne peut donc être faite à priori entre les espèces végétales, étant entendu que de nombreux facteurs de variation possibles liés aux vecteurs, aux conditions édapho-climatiques des lieux de productions et aux souches de *X.f.* peuvent aussi participer à la modulation de la pathogénicité de *Xylella* sur citrus.

- Au sein des études se rapportant à *X. fastidiosa* sur citrus mentionnés dans la synthèse de l'EFSA (2015), la sous-espèce *multiplex* qui est la seule jusqu'alors identifiée en Corse sur l'espèce d'arbuste ornemental *Polygala myrtifolia* et sur genêt d'Espagne (*Spartium junceum*), n'est signalée qu'une seule fois dans l'appendix B page 195 et... à tort semble-t-il!

A la lecture attentive de la publication citée p195 (Schuenzel et al., 2005), on constate que "The sequenced citrus variegated chlorosis (CVC) strain (37) from South America was used as the outgroup.". Sur la figure 1 de la page 3835 de cette publication confrontée avec la table 1 (p. 3833) on voit effectivement que la souche 9a5c n'a rien à voir avec *multiplex* (elle appartient en fait à la sous-espèce *pauca*). Les auteurs ont simplement utilisé cette séquence ADN pour avoir une référence extérieure afin de positionner les séquences de leur étude entre elles. Diverses études non limitatives (Simpson et al., 2000; Yuan et al., 2010; Parker et al., 2012; Elbeaino et al., 2014) attestent en effet que le souche 9a5c appartient bien à la sous-

espèce *X.f.* subsp. *pauca*. Ces considérations font qu'aucune souche de la sous-espèce *X.f.* subsp. *multiplex* n'a été notifiée sur citrus, toutes espèces confondues.

Si la sous-espèce *X.f.* subsp. *multiplex* apparaît avoir la plus grande gamme d'hôtes d'espèces végétales exprimant les symptômes de la maladie, celle-ci est subdivisée en divers sous-groupes qui sont le plus souvent associés à des hôtes spécifiques (comme l'amandier, le prunier, l'abricotier, le platane, l'orme, le ginkgo, le chêne...etc.) avec une liaison étroite entre les génotypes des souches et les espèces de plantes hôtes (Nunney et al., 2013).

Conclusions

Les deux souches de *X.f.* subsp. *multiplex* présentes en Corse n'attaquent apparemment pas les citrus. Les risques en découlant quant au commerce de clémentines accompagnées de feuilles demeurent donc quasi nuls en l'état actuel des connaissances

Quels pourraient être les risques liés à la commercialisation des clémentines de Corse vers la France métropolitaine ou les pays de l'U.E. si la sous-espèce pauca de X.f. venait à être introduite en Corse ?

Comme nous l'avons évoqué, l'Analyse des Risques Phytosanitaire de l'EFSA (2015) ne souligne aucune publication mentionnant la bactériose sur les clémentiniers et leurs fruits. En revanche, les études brésiliennes montrent que les variétés d'oranger (*Citrus sinensis*) se révèlent sensibles à des degrés divers à *X.f. pauca* (Della Coletta - Filho et al., 2007) mais que certaines d'entre-elles apparaissent tolérantes à la bactériose (Fadel et al., 2014). La plupart des mandariniers (*Citrus reticulata*) sont considérés comme résistants tandis que les tangerines (hybrides *C. sinensis* x *C. reticulata*) sont généralement résistants avec quelques exceptions et font actuellement l'objet d'une sélection pour leur tolérance avec des essais au stade de démonstration au champ (de Souza et al., 2014).

L'hybride *Citrus x clementina* étant constitué d'un seul parent oranger *C. sinensis* dont certaines variétés seulement sont avérées sensibles et d'un second parent mandarinier *C. deliciosa* dont la sensibilité n'a jamais été évaluée (d'autres espèces de mandariniers étant résistantes!), il est difficile de se prononcer actuellement sur l'état de sensibilité potentielle du clémentinier à la sous espèce *pauca*, même si les conclusions des études brésiliennes sur la résistance d'autres espèces de mandariniers doivent être considérées.

Quels sont les risques de contamination par les fruits, semences et feuilles?

Xylella fastidiosa colonise les arbres de citrus de façon systémique et finit par obstruer les vaisseaux après multiplication et production de biofilms. **La bactérie peut ainsi être détectée dans les nervures centrales des feuilles (Chang et al., 1993), dans le pédoncule des fruits et dans les fruits (Rosetti et al., 1990)** du fait de la continuité du système vasculaire de la plante. **La bactérie peut également être transmise d'arbre en arbre via les anastomoses racinaires** (He et al., 2000).

Suite à des inoculations mécaniques dans des conditions expérimentales équivalentes, les pourcentages de vaisseaux colonisés par la bactérie dans les pétioles des feuilles de citrus sont

beaucoup moins importants que les plants de vigne ou de caféier (Alves et al. 2004), quelle que soit leur position dans le pétiole.

En 2003, Li et al. étudient des fruits de *Citrus sinensis* présentant des symptômes de panachure chlorotique (CVC) et mettent en évidence pour la première fois le passage de la bactérie dans tous les faisceaux vasculaires du fruit jusque dans les graines et l'embryon (test PCR). Le poids de l'embryon des semences infectées de *Citrus sinensis* est trouvé inférieur de 25% par rapport à celui des semences saines, et leur taux de germination est également inférieur. Les graines sont ensuite mises à germer en conditions contrôlées. Les plantules sont testées par PCR (et qPCR) pour la présence de *X. fastidiosa* (racines et parties aériennes) 1 mois après le semis. Sur les 250 plantules testées 23.6% se révèlent positives (dans leurs parties aériennes pour la grande majorité).

La possibilité pour *Xylella fastidiosa* d'infecter et coloniser les fruits et les tissus des semences, puis d'être transmise en passant des semences à la jeune plantule semble donc être démontrée.

Cependant, une dizaine d'années plus tard, Hartung et al. (2014) qui appartiennent au même groupe de recherche que Li et al. (2003) ne parviennent pas à reproduire l'ensemble des résultats. Hartung et al. prélèvent des fruits symptomatiques et asymptomatiques sur des orangers doux infectés par *Xylella fastidiosa*. Testant par PCR les semences extraites de ces fruits, ils montrent que les semences issues de fruits symptomatiques sont contaminées (test PCR) et ont un poids inférieur aux semences provenant des fruits asymptomatiques dû au flux réduit de nutriments. Ils sèment ensuite les graines sous serre pour étudier leur germination et observent que si le taux de germination est comparable, après 3 mois, la croissance des pousses (non celle des racines) est réduite pour les plantules provenant de semences issues de fruits symptomatiques comparée à celles issues de fruits asymptomatiques. Cependant, ils n'observent de symptôme visible de la bactériose sur aucune des plantules. Trois mois puis 17 mois après le semis, aucun résultat positif de présence de la bactérie n'a pu être mis en évidence à partir des racines et nervures principales des feuilles provenant respectivement de 260 et 148 plantules testées (tests PCR et qPCR).

Il n'y a donc apparemment pas transmission des semences aux plantules. Les nervures principales issues de 349 plantules obtenues par des semences récoltées un an plus tard sur la même parcelle et testées après 7 mois de semis ont montré une absence totale de bactéries, **ce qui confirme l'absence de transmission verticale de *X. fastidiosa*.** Les auteurs interprètent les différences de résultats entre les deux études par le fait que soit i) les arbres de la première étude présentaient une charge bactérienne plus forte (tous les fruits étaient symptomatiques) soit ii) comme les tests PCR avaient été effectués un mois après la germination, des bactéries ont pu être détectées mais elles sont mortes ensuite (ou seules des cellules mortes ont été détectées).

Une étude à plus long terme de Della Coletta-Filho et al., (2014) conduite pendant 7 années sur *Citrus sinensis* et visant à évaluer la transmission de *X.f.* des semences aux plantules, **n'a donné aucun résultat positif.** Même en colonisant toutes les parties du fruit

(exocarpe, axe central et endocarpe) et de la semence (tégument, endosperme et embryon) la bactérie n'a pu être transmise aux plantules issues de semis.

Une autre étude de Cordeiroa et al., (2014) confirme également que des plantules d'oranger doux obtenues à partir de semences provenant de fruits infectés avec symptômes de *X.f. subsp. pauca* sont indemnes de la bactérie (analyse PCR); *X.f. subsp. pauca* ne fut pas détectée en PCR sur les feuilles et semences des différents cultivars de citronnier (*Citrus limon*) entourés par des vergers d'oranger doux fortement atteints par la bactériose. Il peut être conclu que ***X.f. subsp. pauca* ne peut être transmise verticalement de la semence à la plantule pour *C. sinensis*.**

Conclusions

De l'ensemble des données résumées ci-dessus, il ressort que la transmission et la dissémination par les semences issues de fruits des cultivars et variétés de citrus cultivés dans la zone brésilienne, où la panachure chlorotique (CVC : Citrus Variegated Chlorosis) causée par *X.f. subsp. pauca* est endémique, sont improbables. Ces considérations se trouvent renforcées du fait de l'absence totale de la bactérie *X.f. subsp. pauca* en Corse.

-Si toutefois par hypothèse, des souches pathogènes de citrus (ex : X.f. subsp. pauca brésiliennes) parvenaient à coloniser la Corse, et que selon toute invraisemblance, les fruits et semences contaminés pouvaient potentiellement produire des plantules contaminées, la survenue d'une transmission et propagation liée au commerce des clémentines feuillées nécessiterait que les semences issues des fruits consommés se retrouvent en situation de germer. Ceci pourrait ne pas être exclu mais hautement improbable compte tenu des circuits d'évacuation des déchets de consommation ménagers où pelures et pépins de fruits, et feuilles se retrouvent. Les déchets de consommation connaissent souvent des destructions ultimes, ou subissent des cycles de compostage à température élevée en cas de tri des déchets organiques, ou encore connaissent des conditions de stockage défavorables à la germination dans des décharges fourre-tout souvent isolées de leur environnement.

- Il faut ajouter le caractère d'incertitude qui pèse sur les durées de vie réelles des bactéries X.f. et de la pérennité de leur caractère infectieux sur des feuilles détachées de leur arbre, qui subissent flétrissement, changement de couleurs, plasmolyse et sénescence, et dont l'attractivité vis-à-vis d'éventuels vecteurs potentiels ne manque pas de s'en trouver modifiée.

-Par ailleurs, doit aussi être prise en compte la nécessaire présence d'insectes vecteurs susceptibles de transmettre la bactériose. Or, les plantes de citrus du continent potentiellement exposées à la bactériose hypothétiquement introduite, sont des plants de citrus (surtout citronnier) présents dans l'environnement cultivé dans le sud de la France sur la frange côtière méditerranéenne, (citronnier qui sont résistants à X.f. subsp. pauca) ou des citrus d'ornement présents sur le territoire national qui passent le plus souvent une partie de leur période de végétation dans les orangeries ou en conditions protégées, peu accessibles aux vecteurs potentiels, en particulier de ceux qui pourraient être transportés lors du commerce de clémentines pendant la période hivernale.

Ni la bactériose à X.f. subsp. pauca, ni ses vecteurs infectieux n'existant probablement pas sur le territoire français continental, il faudrait alors que les vecteurs infectieux qui accompagnent les clémentines pendant toutes les phases de récolte, conditionnement et transport puissent être importés en même temps que les clémentines, en bon état pour transmettre X.f..

Les clémentines conditionnées et introduites en France continentale ne subissent des ruptures de charge et des allotements croisés que chez les grossistes avant d'être distribuées sur les étals de marchés couverts, de plein vent, ou chez les commerçants de détail ou de la grande distribution. Les clémentines étant mises en marché de fin octobre jusqu'à début janvier, l'ensemble des espèces de plantes hôtes sensibles X.f à feuilles caduques sont en phase hivernale, et celles à feuilles persistantes sont soumises à des conditions climatiques défavorables à l'activité de prise alimentaire des vecteurs potentiels.

Toutes ces phases de mise en marché s'avèrent peu coïncidentes avec des situations spatio-temporelles favorables à l'infection par X.f. subsp. pauca pour les citrus, voire les autres hôtes potentiels en culture ou plantés.

Les risques de contamination des végétaux hôtes continentaux par la bactéries X.f. subsp. pauca qui pourrait être véhiculée par les clémentines feuillées corses suite à une colonisation de l'île par la bactérie qui n'est pas avérée ni d'actualité ni supposée résultent donc d'une cascade d'hypothèses hautement improbables.

Ceux liés à X.f. subsp. multiplex actuellement présents en corse sont quasi nuls et ceux liés par hypothèse à X.f. subsp. pauca sont très faibles pour l'ensemble des raisons évoquées :

- Absence de cette souche multiplex sur citrus dans le monde, et en particulier sur clémentiniers.

- Risque d'entrée de X.f. subsp. pauca via les fruits et les feuilles très faible, mais absence constatée de données expérimentales.

- Possibilité de transmission de X.f. subsp. pauca des fruits-semences infectés vers les plantules infirmée chez l'oranger, nuls pour citronnier et jamais démontrée sur clémentinier, comme d'ailleurs la présence de cette souche en végétation.

- Possibilité d'entrée de X.f. subsp. pauca grâce à des vecteurs transportés avec les fruits et les feuilles faible et risque de transmission à destination sur hôtes compatibles très faible en raison de facteurs défavorables conjugués qui tiennent à la nature périsposables des fruits et feuilles et à leur devenir après leur mise en marché et leur consommation, aux périodes de mise en marché devenir peu propice à la rencontre vecteur-vecté / plantes hôtes

Conclusions

Dans les conditions actuelles d'infestation de la Corse par *X.f. subsp multiplex* sur *Polygala*, le commerce des clémentines corses accompagnées de feuilles ne semble pas présenter de risques particuliers pour la santé des végétaux-hôtes présents sur le continent. Les conditions de commercialisation telles que pratiquées par les acteurs professionnels, peuvent donc perdurer sans modification.

*4.1.2.2. Le commerce des plants végétaux, produits végétaux et les risques de propagation de *Xylella fastidiosa**

De l'avis même des acteurs des filières agricoles et horticoles de Corse, le commerce extérieur de végétaux ou produits végétaux hôtes de *X.f. subsp. multiplex*, ou plus largement spécifiés vis-à-vis de l'ensemble des sous-espèces de *Xylella fastidiosa* et destinés à la France continentale est pratiquement inexistant (à l'exception des citrus) pour la quasi-totalité des espèces....notamment pour les oliviers, les prunus fruitiers, la vigne et les plants ligneux d'ornement.

Les grands mouvements de population qui ont lieu pendant les mois d'été à la faveur des périodes de vacances pourraient constituer une occasion particulière pour les touristes de ramener des plantes, ou encore de véhiculer involontairement des insectes volants éventuellement vecteurs potentiels. **Des campagnes d'information** portant sur les risques de propagation et la dangerosité de la bactérie, déjà mises en œuvre, pourraient à cet égard être encore **mieux coordonnées, renforcées et systématisées à tous les lieux et modes de passage entre la corse et le continent.**

Les échanges se font donc presque exclusivement du continent et des pays du sud de l'UE vers la Corse, tant pour les plants ornementaux que pour les plants fruitiers et de vigne. Ainsi les Polygales à feuilles de myrte fortement infectés en Corse par *X.f. subsp. multiplex* ne sont aucunement exportés vers le continent, mais sont importés ou produits sur place.

Les plants d'agrumes font toutefois l'objet d'un flux en provenance de Corse, en raison de l'importance de la collection maintenue par l'INRA-CIRAD de San Giuliano (Nord-est de la Corse), qui comprend près de 1100 accessions et qui est l'une des plus importantes du monde, notamment pour les mandariniers.

La diffusion du matériel végétal de citrus maintenu en corse se fait dans près de 40 pays producteurs d'agrumes, sous forme de greffons et de vitro-plants pour les variétés et surtout de semences pour les porte-greffes, à des fins de travaux de recherche ou de sélection. Les expéditions vers les Antilles françaises, les pays du Maghreb et Moyen-Orient sont dominantes et concernent une très grande variété d'espèces et de cultivars. **Si les semences présentent des risques de propagation négligeables de *X.f.* (même si les citrus de corse étaient en situation d'infection déclarée), il n'en va pas de même des greffons ou des plants racinés pour lesquels les risques seraient importants en cas d'infection.**

Les collections, actuellement maintenues en plein champ sur 13 ha de vergers, ne sont pas à l'abri de contamination par des parasites de quarantaine non encore présents sur l'île ou de leur vecteur, mais présents dans les pays du sud de l'E.U voire ailleurs dans le monde.

Diverses actions de sécurisation de la conservation et de certification des ressources génétiques agrumes de San Giuliano sont prévues sur la période 2014- 2020 :

- la **cryoconservation** permettant de conserver à très basse température (-196°C) des organes (graines, apex de rameaux) capables de régénérer des plantes entières. Cette technique permet d'étendre le nombre de génotypes conservés dans des conditions de sécurité de long terme et à moindre coût. Cette technique adaptée aux particularités des espèces,

permet de s'affranchir des risques phytosanitaires et des conséquences des éventuels accidents climatiques,

- la **culture des génotypes essentiels sous serre** ‘insect – proof’ de 1000 m² environ qui permettrait de conserver la moitié des ressources génétiques, et de maintenir les pieds mères des variétés inscrites au catalogue officiel de la certification fruitière dans un parfait état phytosanitaire.

- la **certification du processus de production végétale selon la norme NF 596-900** destinée à maintenir un excellent état sanitaire des plants selon un haut niveau de fiabilité en raison d'habilitation d'un personnel, de locaux et d'équipements dédiés à la sécurisation sanitaire des plants conservés.

Conclusions

En considérant l'état actuel de la situation corse quant aux infections aux seules espèces *Polygala myrtifolia* et *Spartium junceum* par deux souches de *Xf.* subsp. *multiplex*, et sachant que cette souche n'a jamais été répertoriée comme infectieuse sur citrus dans le monde, en particulier sur les espèces de citrus pouvant être exportées de Corse, on peut déduire que les risques d'entrée sur le territoire continental des plants, parties de plantes de citrus en provenance de Corse et vecteurs potentiellement infectieux y afférant sont quasi-nuls.

A ce titre, la commercialisation de citrus en provenance de Corse et destiné à la métropole ou autres pays de l'U.E. doit pouvoir se poursuivre sans aucun risque de contamination par *Xylella fastidiosa*, moyennant le respect des réglementations européennes et françaises en vigueur régissant la délivrance du passeport phytosanitaire européen.

Les mêmes conclusions s'appliquent également pour les semences et vitro-plants de citrus *commercialisés*.

Une cinquantaine de passeports phytosanitaires ont été délivrés au cours de la dernière année pour des départs de semences, greffons et vitro-plants de citrus.

Hormis les citrus expédiés à l'extérieur de l'île par le centre INRA CIRAD de San Giuliano, quelques pépiniéristes corses spécialisés dans les productions de citrus expédient des plants de clémentiniers, pomelos et citrus d'ornement à destination de particuliers; nous n'avons pas réussi à obtenir de chiffres précis montrant l'importance de ces flux.

Quels pourraient être les risques liés à la commercialisation des plants ou greffons de citrus de Corse vers la métropole si une sous espèce de X.f. pathogène venait à être introduite en Corse ?

Nous nous tiendrons à quelques conclusions générales dégagées par l'EFSA (2015) pour les introductions de plants destinés à la plantation, qui valent aussi pour les citrus :

- les plants constituent une source et un support adéquat pour le déplacement de la bactérie, en particulier pour les cultivars ou espèces de citrus qui seraient infectieux tout en restant asymptomatiques,

- la possibilité de survie de la bactérie pendant le transport est importante,
- le transfert de la bactérie d'une éventuelle contamination sur greffon à la plante entière après greffage est importante,
- les plants entiers peuvent assez facilement héberger des vecteurs, dont le taux de survie peut toutefois être rendu aléatoire par les conditions de transport et de stockage des plants au cours de la période avant plantation,
- les sous-espèces et souches de *X.f.* pouvant attaquer les citrus peuvent infester d'autres espèces hôtes et trouver ainsi des relais pour s'établir, en particulier dans les zones climatiques méditerranéennes d'exigence pour la culture ou le maintien des citrus,
- la propagation par les vecteurs potentiels principaux est des plus probables en raison de leur large répartition géographique, de leur polyphagie et de leur possibilité de déplacement par le vent à longue distance pour certains d'entre eux.

Conclusions et recommandations

En résumé, le commerce des plants de citrus produits en Corse en situation hypothétique de contamination par des sous-espèces et souches pathogènes de citrus pourraient représenter un risque pour les espèces hôtes de ces mêmes pathogènes en métropole.

Ces risques pourraient être quasi nuls en cas de limitation d'introduction à des semences, ou drastiquement réduits pour les plants racinés, boutures, vitro-plants ou greffons si ceux-ci étaient produits dans des conditions sanitaires irréprochables incluant :

- la mise en œuvre d'un schéma de sélection sanitaire des pieds mères selon des procédures entièrement normalisées assurant une traçabilité parfaite de toutes les opérations de production, de culture et de maintien totalement sécurisées.
- le déploiement des outils nécessaires au maintien des pieds mères sains (régénération par thermothérapie, milieu protégé 'insect-proof, certification et tests sanitaires permanents tout au long du cycle de production, maîtrise des vecteurs potentiels et des plantes hôtes relais dans un environnement de sécurité...)
- l'isolement des sites de production des plants certifiés de leur environnement, la maîtrise intégrale des introductions venant de l'extérieur et la restriction d'accès aux personnels professionnels spécialement formés aux procédures de production et aux mesures d'hygiène.

4.2. Ebauche d'une analyse du risque lié à la présence de *Polygala* naturels et subsponanés et à la commercialisation de *Polygala myrtifolia* et de ses hybrides horticoles (modes de production, flux...)

4.2.1. Présentation de la plante et de la culture de *Polygala* en Corse

4.2.1.1. Contexte

Le genre *Polygala* comprend plus de 500 espèces annuelles, vivaces ou arbustes à feuillage persistant, parmi lesquelles *Polygala myrtifolia*. Originaire d'Afrique du sud, cet arbuste à feuilles persistantes et à port très ramifié fait entre 50 cm et 1,8m de diamètre x 1,5m à 3-4 m de haut et possède un port érigé d'aspect dense et plus ou moins arrondi.

Cette espèce est de plus en plus prisée par les particuliers et paysagistes en raison de la longueur de sa période de floraison (de mars à septembre selon les cultivars) de la couleur attrayante de ses grappes de fleurs rose violacé, et du caractère nouveau de l'utilisation de cette espèce dans la conception des massifs et plantations arbustives.

Planté en zone méditerranéenne et le long du littoral atlantique en plein soleil ou en situation de mi-ombre, cette espèce supporte bien les bords de mer puisqu'elle est tolérante au vent et aux embruns. Son caractère gélif (-5°C) l'empêche d'être plantée en zones froides et continentales, sauf à être maintenue en conteneur sur milieu bien drainé, pour être rentrée l'hiver en situation protégée (serre, véranda, etc.). Cette espèce peut être à la fois plantée en sujet isolé, en massifs, en haies arbustives libres ou brise vent, ou encore maintenue en conteneur qu'il faut arroser sans excès toute l'année.

A ce jour, la Corse connaît une utilisation importante de cette espèce depuis une vingtaine d'années; il semble que cette plante est omniprésente dans la quasi-totalité des communes littorales de l'île et des villages de balcon, jusqu'à 500 m d'altitude environ. La crise phytosanitaire propre aux attaques de *X.f.* subsp. *multiplex* touche actuellement non seulement les pépiniéristes et les professionnels du paysagisme, mais aussi les collectivités publiques et privées, les particuliers, les propriétaires de résidences secondaires et les hébergeurs (hôtels, gîtes et terrains de camping).

4.2.1.2. les caractéristiques botaniques des polygales naturels et horticoles

L'espèce *Polygala myrtifolia* est subsponanée dans deux régions italiennes (Pignatti, 1982), dans la région de Menton (Fournier, 1961) et en Corse où sa présence est, depuis longtemps, bien documentée à l'ouest d'Ajaccio à proximité de la mer, aux endroits nommés Scudo et Ariadne comme naturalisée parmi les lentisques (Thellung, 1911; Paradis, 1987; Conrad and Paradis, 1988) et dans les carrières dites de Scudo et thalwegs proches. Les espèces de polygales naturels se reproduisent par graines qui poussent sur place, ou après avoir été naturellement propagées par les oiseaux, fourmis, vent, eau de ruissellement etc.

Le tableau 3 ci-dessous présente les 6 espèces de Polygala existant à l'état naturel en Corse (d'après les renseignements fournis par L. Hugot : CNBC). Des photos illustrant chacune de ces espèces sont présentées en [annexe 12](#)

Espèces de polygales	Caractéristiques botaniques	Etage de végétation en Corse	Localités (<i>Nombre</i>) et indice de rareté	Origine bio-géographique
<i>Polygala myrtifolia</i> p. à feuilles de myrte	Vivace, feuilles de 3-5 cm, corolle lilacée, longue 13-18 mm, floraison juin-juillet phanérogame, 1-2,5 m de haut	Thermo- méditerranéen Fruticées sublittorales	Ajaccio (iles sanguinaires) Bonifacio (Ile de Cavallo) (2) <i>Très rare</i>	Subspontané, originaire d'Afrique du sud
<i>P. monspeliaca</i> p. de Montpellier	Annuelle, ailes longues de 7-8 mm, corolle blanchâtre, longue de 4-5 mm, capsule 5-6 mm floraison avril-juin thérophyte, 5-25 cm de haut	Thermo- méditerranéen ; méditerranéen Fruticées, pelouses	Tenda, Cintu, San Petrone, Ritondu <i>Assez rare</i>	Sténo-méditerranéenne
<i>P. serpyllifolia</i> P. à feuilles de serpolet	Vivace, ailes longues de 4-5 mm, corolle blanche ou rosée, longue de 3-5 mm ; capsule longue de 3-5 mm floraison avril-juin hémicryptophyte, 3-12 cm haut	Montagnard, sub-alpin Pozzines	Du Ritondu à Baveda <i>Assez rare</i>	Europe centrale
<i>P. nicaeensis</i> <i>subsp. Corsica</i> P. de Corse	Vivace, ailes longues de 8-10 mm, corolle souvent rose, longue de 8-9 mm ; capsule longue de 5-6 mm floraison avril-juin hémicryptophyte 10-40 cm de haut	Thermo- méditerranéen, méditerranéen sub-montagnard, montagnard Fruticées, pelouses	Assez fréquent dans le Capicorsu, disséminé ailleurs <i>Assez rare</i>	Endémique de Corse, Italie du nord, d'origine eury-méditerranéenne
<i>P. vulgaris</i> <i>subsp. vulgaris</i> P. commun	Vivace, fleurs bleues, roses ou blanches capsule longue de 5-6 mm floraison mai-juillet hémicryptophyte 8-28 cm de haut	méditerranéen, sub-méditerranéen , montagnard, sub-alpin Pelouses, fruticées, forêts claires	NOMBREuses communes <i>Commune</i>	Eurasiatique
<i>P. alpestris</i> <i>subsp. alpestris</i> P. des Alpes	Vivace, fleurs bleues lavées de blanc, capsule longue de 3-4 mm floraison juin-juillet hémicryptophyte 5-10 cm de haut	Montagnard pelouses	Monte Muffraje (1) <i>Rare</i>	Oro-sibérienne Sud Europe

Les divers cultivars horticoles de *P. myrtifolia* et de ses hybrides commercialisés

Les catalogues botaniques des fournisseurs répertorient divers cultivars et espèces de *Polygala* mis en marché qui sont les suivants :

- ‘Bibi Pink’: ce cultivar hybride issu de *P. myrtifolia* et *P. oppositifolia* est surtout planté dans les petits jardins, les rocailles et en bord de mer. Il a un port très compact, environ 1m de haut par 1 m de large, sa floraison mauve violacé est abondante de juin à octobre et son feuillage arrondi de couleur vert gris, il résiste assez bien au froid jusqu’à -9°C -10°C

-*Polygala myrtifolia* ‘grandiflora’ = *P. dalmaisiana* issu du croisement *P. myrtifolia* et *P. oppositifolia*, fait environ 1,50m haut pour 1m large; son port arrondi, ses feuilles sont vert acide, étroites et lancéolées, et ses fleurs violet magenta avec étamines partiellement blanches.

Les différents cultivars de cet hybride sont déclinés selon des variantes de port, de forme de feuillage ou de floraison (‘Nana’ à port trapu’ , ‘Compact’ à floraison printanière précoce,

-Divers cultivars de *Polygala myrtifolia* sont aussi commercialisés tels que ‘Chapman Field’ au port arrondi de 1,25m à 2m de haut, tolérants jusqu’à -6°C et adapté aux sols secs et pauvres, ‘Liddle Charmer’ de petite taille de 0,8m de haut et de large à feuilles vert acide à vert gris, ‘White Feathers’ aux fleurs blanches avec un pic de floraison d’août à octobre. Des espèces autres que *P. myrtifolia* et ses hybrides font l’objet d’un commerce horticole comme *P. virgata*, *P. chamaebuxus* , *P. oppositifolia* et *P. fruticosa* avec parfois des cultivars bien caractérisés pour certaines de ces espèces.

Au sein de la pépinière visitée au cours de notre mission, l’identité des cultivars commercialisés n’était pas notée sur l’étiquette. Par ailleurs, **nous n’avons aucune donnée sur d’éventuels niveaux de sensibilité différente des cultivars à *X.f. multiplex*.**

4.2.1.3. Problèmes phytosanitaires autres que Xylella rencontrés sur Polygales

Cette espèce nouvellement plantée dans notre pays se révèle peu attaquée par les maladies et le ravageurs, contrairement à son pays d’origine, l’Afrique du Sud (Adair et al., 2011). Le réseau national d’épidémio-surveillance signale des attaques d’aleurodes en Bretagne et l’Astredhor fait état de présence de pucerons (probablement *Aphis craccivora*).

En Italie, pays fournisseur de *Polygala* pour la France, de sévères dépérissements se caractérisant par des nécroses du collet et des tiges, la destruction des systèmes racinaires et des dépérissements de plants ont été attribués à des attaques de *Fusarium oxysporum* et *F. solani* dès 2012-2013 (Vitullo et al. 2014). La maladie la plus fréquente est certainement *Calonectria pauciramosa* trouvée dès 1993 dans différentes pépinières de l’est de la Sicile, puis en Sardaigne, Calabre en 1996-97 (Polizzi and Crous, 1999) puis en Espagne en 2004 dans la région de Valence (Pérez - Sierra et al., 2006) avec une estimation de 3% de pertes de pieds de polygala en pépinières. Cette maladie ne peut être confondue avec *X.f.* en raison de symptômes différents se caractérisant notamment par des chloroses suivies d’une chute des feuilles, avec des dépérissements de pousses et nécroses sur collet et tiges.

4.2.2. Analyse des situations d’infestation des polygales en Corse

4.2.2.1. Les polygales subsponanés pourraient-ils être la source de contamination de *Xf. subsp. multiplex* sur les Polygala myrtifolia horticoles en Corse ?

Six espèces sont établies en Corse dont quatre sont susceptibles d’être présentes dans des conditions environnementales similaires à celles où sont plantés les polygales horticoles. Les plantes en place sont établies depuis des périodes bien antérieures à celles qui ont vu la culture et les plantations de polygales horticoles.

Une des questions légitimes est de savoir si ces plants à l’état naturel auraient pu être contaminés et devenir sources des contaminations actuelles sur les polygales cultivés ?

La connaissance de leur état sanitaire actuel est forcément incomplète et ne peut être relié à des résultats d’analyse d’échantillons, puisqu’aucun n’a jamais été prélevé. **Les visites effectuées au cours des mois et années précédentes par les botanistes du Conservatoire National de Botanique (CNBC), dans le cadre de visite de surveillance ou d’inventaires, n’ont jamais alerté ces agents par la constatation d’état végétatif déficient, ou symptomatique anormal** (L. Hugot - CNBC). Ces évocations devraient pouvoir être confirmées, pour lever toute ambiguïté, par des visites de surveillance et de prélèvements systématiques d’échantillons pour analyse sur de sujets asymptomatiques de chacune des espèces. **Des prélèvements de faune pour vérifier la présence éventuelle d’insectes vecteurs potentiels et de leur état d’infectiosité pourraient également être effectués.**

Avant d’être en mesure d’analyser les résultats de ces futures investigations, **on peut toutefois émettre l’hypothèse que l’antériorité de la contamination des polygales présents à l’état naturel semble très improbable pour différentes raisons :**

Ceux-ci sont présents à l’état naturel depuis des décennies, bien avant les premières signalisations de la bactériose *Xf.* en Europe. La consultation du prodrome de la flore de Corse (Briquet and de Litardière, 1936) atteste que les 5 espèces de *Polygala* de Corse sont mentionnées depuis le début du vingtième siècle, soit dès les années 1908 pour *P. serpyllifolia*, 1909 pour *P. myrtifolia* subsponanée et abondamment naturalisée parmi les lentisques de Scudo, près d’Ajaccio, 1907 pour *P. nicaeensis* subsp *corsica*, 1905 pour *P. monspelliaca* et 1904 pour *P. vulgaris*). Une seule espèce *P. alpestris* n’est signalée que depuis les années 90 (Gamisans and Jeanmonod, 1993).

Or jusqu’à ce jour, ils semblent être demeurés en Corse sans aucun signe de symptômes.

Certaines espèces de ces polygales sont cantonnées aux zones d’altitude où la bactérie ne peut survivre et se multiplier (zones trop froides).

Aucun signalement sur la sensibilité de ces espèces n’a été fait dans le monde (mais aucune étude n’a vraiment été réalisée). Partant de l’hypothèse vraisemblable que la source d’une nouvelle contamination pourrait provenir d’une espèce végétale reconnue sensible (mais peut-être tolérante) depuis longtemps (donc capable d’héberger durablement et de multiplier la bactérie) et qui a fait l’objet d’un commerce international pour assurer sa dispersion par rapport aux pays contaminés originellement, la bactérie n’a pu donc arriver en Corse que par une introduction (de plants et/ou vecteurs contaminés), et qui ne peut concerner les espèces de polygales naturels.

Conclusions et recommandations

L'hypothèse d'une contamination de *Polygala myrtifolia* par les polygales naturels qui auraient pu être préalablement infectés, semble très peu vraisemblable. Sous réserve de la confirmation de leur bon état sanitaire attesté par des analyse d'échantillons de plantes asymptomatiques, les polygales naturels doivent être traités à part des polygales horticoles touchés par des mesures de gestion relatives aux foyers.

Si les polygales naturels ne semblent pas pouvoir être la source de l'épidémie actuelle, nous n'avons aucune donnée sur d'éventuels niveaux de sensibilité à *X.f. subsp. multiplex* des espèces naturelles et cultivars, il est donc important de réaliser une surveillance de ces espèces (en particulier celles de plaines)

4.2.2.2. Analyse de la situation des infestations de Polygala horticole en Corse

L'analyse de la situation des infections de *X.f. subsp. multiplex* en Corse est basée sur les résultats globaux fournis par le point de synthèse au 26/08/2015 de la Mission des Urgences Sanitaires (MUS) de la Direction générale de l'alimentation (DGAL). Si la situation venait à évoluer il se peut que certaines de nos conclusions doivent être revues.

Une espèce principale ornementale infectée: Polygala myrtifolia

Sur les 558 prélèvements d'échantillons effectués, 475 d'entre eux ont été analysés donnant **133 résultats positifs** répartis pour **96,25 % sur polygales horticoles *Polygala myrtifolia* et *P. x dalmaisiana***, et pour 3,75 % sur le genêt d'Espagne *Spartium junceum*,

L'ensemble des échantillons positifs est atteint par deux souches de la sous espèce *X.f. subsp. multiplex*, et non pas par la souche *X.f. subsp. pauca* CoDiRO détectée en Italie sur une quinzaine d'espèces végétales dont l'olivier, le laurier rose, l'amandier ...et les polygales.

On note également que l'analyse MLSA faite à l'INRA montre qu'une des deux souches de *X.f. multiplex* est identique à la souche Dixon et l'autre à la souche Griffin-1.

Ces résultats constituent une succession d'évènements inattendus, puisque les professionnels et les gestionnaires spéculaient à priori sur une infection en Corse par *X.f. subsp. pauca* (souche CoDiRO), à la fois pour des raisons géographiques de relative proximité, d'importance des flux commerciaux avec l'Italie et ses îles (Sicile, Sardaigne) et de compétence de souche du pathogène vis à vis des polygales démontrée en Italie (Saponari et al., 2014a).

Or les polygales corses sont tous infectés par deux souches de la sous espèce ‘*multiplex*’ de *X.f.*, jamais encore notifiée en Europe sur aucune espèce végétale hôte, ni dans le monde comme pathogène des polygales. Ces deux souches sont rarement présentes ensemble sur une même localité.

Une fois l’infection connue et établie en Corse, considérant que les souches *multiplex* sont signalées sur le continent américain sur un assez grand nombre d’espèces ligneuses fruitières et ornementales (dont certaines comme le chêne, *Prunus*, platane... sont importantes en Corse) on pouvait s’attendre à des infections multi-spécifiques, au moins sur quelques-unes des espèces végétales reconnues comme sensibles.

Les résultats d’analyses des espèces hôtes de *X.f.* subsp. *multiplex* ne corroborent pour le moment pas ces hypothèses. **Sur les 257 prélèvements réalisés sur diverses espèces hôtes se trouvant dans l’environnement des polygales atteints au sein des foyers, tous les échantillons prélevés sur ces espèces-hôtes sont négatifs, à l’exception de 5 échantillons sur genêt d’Espagne (*Spartium junceum*)**, qui représentaient 1,94% du nombre total d’analyses pratiquées sur les espèces hôtes autres que *Polygala*. Rappelons que le genêt d’Espagne est donnée sensible, comme les polygales, à la souche *X.f.* subsp. *pauca* CoDiRO. **Cela étant, il est important de maintenir le suivi des espèces végétales connues pour être sensibles à *X.f.* subsp. *multiplex* et de multiplier les prélèvements afin de s’assurer que les contaminations n’existent pas.** Ceci est en particulier important pour les espèces françaises de plantes-hôtes connues des souches Griffin-1 et Dixon.

Il faut garder en tête que si la sous-espèce *multiplex* semble divisée en entités génétiques à spectres d’hôtes plus réduits aux USA (« amandier »/ « chênes » / « pêcher »/ (Nunney et al., 2013)), les groupes de séquences n’ont qu’un faible support et des études plus poussées sont nécessaires (il y en a trop peu à l’heure actuelle pour conclure). En conséquence, un suivi des chênes et *Prunus* corses est clairement préconisé en particulier dans les zones de plaines présentant un climat favorable au développement de la bactériose.

Hypothèses sur les origines des contaminations en Corse

Elles seront émises et examinées à partir de plusieurs constatations:

- celles ‘de terrains’ effectuées par les membres de cette mission au cours des visites de différents sites de polygales infectés ;
- celles résultant d’études de la traçabilité amont de l’ensemble des foyers déclarés en Corse, voire aval lorsque les foyers concernent une production de pépinière ou des lots revendus par un pépiniériste revendeur ;
- enfin celles dérivant des données générées par l’enquête de la brigade nationale d’enquête vétérinaire et phytosanitaire (BNEVP) qui a contribué à identifier les circuits commerciaux de polygales, apprécier la répartition géographique des ventes et éclaircir la complexité des circuits de production et de vente tant en France qu’en Europe.

Les constatations de terrain pendant le temps de la mission

Les sites contaminés visités (se reporter à [l’annexe 4](#) ‘calendrier de la mission’) comportaient globalement des Polygales infectés le plus souvent gravement atteints, montrant

des symptômes qui s'avèrent de prime abord peu discriminants, mais qui, une fois examinés de près et selon une démarche ‘diagnostic’, apparaissent assez différents de symptômes liés à des pathologies fongiques classiques ou à des stress climatiques.

Les sites avec polygales infectés étaient situés selon une typologie d’espaces très différents (pépinière revendeur, zones urbaines, zones artisanales, propriétés privées en lotissement, ou en pleine nature parfaitement isolées, collectivités privées, terrain de camping) sur la frange côtière sud-ouest de l’île.

Les polygales atteints étaient introduits depuis des durées variables, allant de situation de mise en marché en pépinière, à des plantations en place depuis quelques années, souvent de 2 à 7-8 ans, jusqu’à même une durée plus longue de 15 ans.

Les polygales étaient le plus souvent environnés d’autres plantations allant d’une distance très proximale (1m), jusqu’à plusieurs hectomètres en fonction de la taille des propriétés et des densités de plantations. Ces plantations autres comprenaient souvent des espèces hôtes de la souche *X.f. subsp. multiplex*, ou d’autres espèces végétales dites spécifiées sensibles à d’autres sous espèces et souches de *X.f.*. Les espèces les plus représentées comprenaient des chênesverts, oliviers, amandiers, pêchers, pruniers, vigne, prunus d’ornement, laurier rose, romarin, *Westringia*, micocoulier, etc., sur lesquelles des échantillons ont été abondamment prélevés pour analyse de détection de la bactérie au laboratoire.

Parallèlement à ces visites, une recherche d’insectes potentiellement vecteurs a donné lieu à des captures par fauchage dans les strates arbustives et herbacées, et battage de rameaux des plantes ligneuses. Les prélèvements, dont le bilan est fourni dans ce rapport, dépasse 1500 insectes mais les effectifs collectés sur polygales sont quasi-nuls et ceux sur plantes hôtes autour des sites assez faibles, en raison de la période chaude estivale propice à un ralentissement de l’activité des insectes (estivation).

Les questions posées et conclusions partielles :

- Pourquoi n’a t-on rencontré sur le terrain que des polygales atteints et pas d’autres espèces hôtes de *X.f. subsp. multiplex* ?

Cette récurrente question posée aux membres de la mission a été examinée sous plusieurs angles :

0- On note d’abord que notre présence sur le terrain a été très courte et que les analyses menées par les services de l’Etat en Corse se poursuivent. Cette constatation n’est donc valable qu’à l’instant de l’écriture du rapport. Il est possible de trouver des positifs dans les mois qui suivront ce rapport. Ces pourquoi les suivis sont très importants pour prévenir une épidémie plus large.

1- Cela étant sous l’angle de la correspondance entre les états sanitaires observés sur le terrain et les résultats d’analyse : la correspondance est ‘presque parfaite’ puisque les résultats d’analyse des *Polygala* symptomatiques pressentis infectés sont pratiquement toujours revenus positifs, ceux visuellement incertains sont revenus parfois positifs et le plus souvent négatifs, et ceux des plantes hôtes environnantes asymptomatiques, ou présentant des symptômes visuellement non identifiés sont tous revenus négatifs.

Les polygales semblent incontestablement très sensibles aux souches de la sous espèce *multiplex* de *X.f.* détectée en Corse.

2- Ensuite sous l'angle de la provenance de cette souche ? Aurait-elle pu exister de façon asymptomatique en Corse, sur quelles espèces végétales ? et être transmise sur polygales par des insectes vecteurs infectieux en place ?

***Xf. subsp. multiplex* n'ayant encore jamais été signalée en Europe**, sa provenance originelle demande à être éclaircie. Le délai de réponse à cette question risque d'être assez long du fait de la nécessaire mise en œuvre de méthodes d'analyse performantes combinant une étude rétrospective détaillée de flux de végétaux entre le continent américain et l'Europe, et des méthodes d'analyse précises des génomes des sous espèces et souches *X.f.* visant à retracer leur évolution (si recombinaison) et leur progression spatio-temporelle.

La question de la présence de *X.f.* asymptomatique sur certains végétaux est posée, mais compte tenu de la grande variété d'hôtes végétaux possibles de la sous-espèce *X.f. subsp. multiplex*, il est peu probable d'envisager qu'une large répartition de la bactérie ait pu rester inaperçue et asymptomatique sur toutes les espèces hôtes potentielles, sachant que certaines espèces sont reconnues très sensibles à des souches similaires de *X.f. subsp. multiplex* trouvée en Corse (selon analyse du laboratoire de l'ANSES)

La question de l'éventuelle contamination des polygales horticoles par les polygales sauvages qui aurait pu être asymptomatiques mais infectieux a été discutée précédemment et écartée.

Quant à l'hypothèse de contamination des polygales en Corse par des vecteurs préalablement infectieux sur le territoire de l'île, elle est difficile à envisager. Onze espèces de vecteurs potentiels sont actuellement identifiées en Corse (voir liste fournie en [annexe 2](#)). La plupart d'entre eux colonisent un grand nombre d'hôtes, et le pouvoir de transmission de *Xylella* par certains d'entre eux a pu être fortement suspecté ou démontré en Italie (Elbeaino et al., 2014; Saponari et al., 2014b) ou sur le continent américain.

La plupart des vecteurs ne sont pas spécifiques ni de leurs plantes d'alimentation, ni des souches vectées de la bactérie. Ils sont donc multicomptétents sur de nombreuses espèces végétales (Redak et al., 2004). Des taux de réussite de vection variables sont cependant observés pour des vecteurs différents, et pour un même vecteur sur diverses espèces végétales (Marucci et al., 2008; Lopes et al., 2009).

S'il y avait eu contamination des polygales préalablement sains par des vecteurs en place, pourquoi d'autres espèces-hôtes de ces souches ne seraient pas aussi massivement infectées que les polygales ? Une réponse possible à cette interrogation résulterait à la fois d'une spécificité des souches *X.f.* pathogènes des polygales qui seraient la seule espèce à développer des symptômes, et d'une spécificité d'un ou plusieurs vecteurs efficaces qui ne seraient capables de transmettre qu'aux polygales. Aucun cas analogue n'a pu être trouvé dans la bibliographie, et nous considérons cette hypothèse improbable. De plus, la souche Dixon a été trouvée sur amandier, arbre testé négatif jusqu'à présent en Corse.

Par ailleurs, où ces vecteurs auraient-ils pu devenir infectieux en Corse ?, sauf à admettre que certains d'entre eux auraient pu être introduits dans un état infectieux en accompagnement d'importation de végétaux extérieurs à la Corse.

Les déplacements à longue distance n'ayant été signalés que pour certains vecteurs (*Macrostelus sp.*) qui ne sont pas forcément considérés comme vecteurs potentiels de *X.f.*,

nous n'avons pas envisagé un transfert par migration à longue distance d'insectes vecteurs, fort improbable vues les capacités de vols de ces insectes.

Soulignons toutefois que de nouvelles études sont nécessaires pour parfaire les inventaires des espèces de vecteurs potentiels sur le territoire corse (par exemple à d'autres périodes où d'autres espèces d'insectes pourraient être actives), pour connaître leur éventuel état d'infectiosité, leur répartition géographique puis ce qui pourrait être leur compétence particulièrement efficace pour la transmission de X.f. subsp. multiplex sur polygales

Hormis les attaques sur polygales, **un cas de genêt d'Espagne** trouvé infecté concerne un individu, dont l'origine est identique à celle de deux plants de Polygale trouvés également infectés par la même sous espèce et souche *X.f.*. Planté en 2007, celui-ci a engendré sur place des **plants issus de semis ou rejets** (cette interrogation n'est pas éclaircie) qui se sont révélés également positifs. La traçabilité amont sur l'origine du plant (pépinière du Var) nous indique une **unité de lieu de production** (avec opérations d'entretien sans doute similaires entre genêt et polygale dans un espace-temps commun) de même qu'une unité de lieu en aval des plants parents et fils des genêts positifs.

Bien que subsistent des incertitudes sur les causes ultimes de ce plant contaminé (on ne peut pas définitivement exclure l'action de vecteurs), nous émettons l'hypothèse qu'une transmission et contamination des polygales au genêt planté en 2007 aient pu se produire à la faveur d'une opération de taille de formation des plants par des outils non désinfectés, ou autres causes de transfert par le matériel de culture, sur le lieu de production. Pour la contamination aval des échantillons prélevés sur des plants fils (issus de semences ou de repousses de pied parent planté en 2007), **il apparaît que la cause de transmission la plus probable résulte d'un passage de la bactérie par greffe racinaire entre le 'pied mère' et les 'pieds fils'**, phénomène généralisé habituellement observé pour les plants d'une même espèce plantés à des distances rapprochées.

Nous considérons que la transmission par la semence (au cas où les jeunes pieds prélevés seraient issus de semences) est très improbable compte tenu des études spécifiques assez démonstratives auxquelles nous nous sommes référés et que nous avons déjà signalées précédemment dans ce rapport.

Conclusions et recommandations

- Nous rappelons que nos conclusions reposent sur l'analyse de la situation qui nous a été communiquée par la MUS de la DGAL au 26 août 2015. Si la situation venait à évoluer il se peut que certaines de nos conclusions doivent être revues.
- L'hypothèse de contamination des polygales en Corse par des vecteurs préalablement infectieux sur le territoire de l'île, est difficile à envisager.
- Bien que subsistent des incertitudes sur les causes ultimes du plan de genêt contaminé (on ne peut pas définitivement exclure l'action de vecteurs), nous émettons l'hypothèse qu'une transmission et contamination des polygales au genêt planté en 2007 aient pu se produire à la faveur d'une opération de taille de formation des plants par des outils non désinfectés
- La spécificité des attaques actuellement observées sur polygales nous incite à privilégier un processus de contamination pour la filière *Polygala* en particulier, qui peut survenir préférentiellement en début, et dans une moindre mesure tout au long de la filière de production des plants, mais l'action des vecteurs nécessite d'être scientifiquement écartée
- Des études sont nécessaires pour parfaire les inventaires des espèces de vecteurs potentiels sur le territoire corse, pour connaître leur éventuel état d'infectiosité, leur répartition géographique, sur les possibilités de contamination de la sous espèce *X.f. subsp. multiplex* sur les autres espèces végétales hôtes en Corse et ce qui pourrait expliquer une compétence particulièrement efficace pour la transmission de *X.f. subsp. multiplex* sur polygales
- Il est important de maintenir le suivi des espèces végétales connues pour être sensibles à *X.f. subsp. multiplex* et de multiplier les prélèvements afin de s'assurer que les contaminations n'existent pas. Ceci est en particulier important pour les amandiers car on rappelle qu'une des deux souches de *X.f. subsp. multiplex* possède le même profil allélique que la souche Dixon attaquant les amandiers aux USA. Si la sous-espèce *multiplex* semble divisée en entités génétique à spectres d'hôtes plus réduits aux USA (« amandier » / « chênes » / « pêcher »), les groupes de séquences n'ont qu'un faible support et des études plus poussées sont nécessaires (il y en a trop peu à l'heure actuelle pour conclure). En conséquence un suivi des chênes et *Prunus* corse est clairement préconisé en particulier dans les zones de plaines présentant un climat favorable au développement de la bactériose.

Les actions de traçabilité amont et aval des foyers en Corse

Dès l'apparition des premiers foyers de fin juillet, la DRAAF Corse s'est préoccupée de connaître l'origine des plants présents dans les foyers détectés contaminés. En date du 26 août 2015, soit un peu plus d'un mois après la découverte du premier foyer à Propriano, pas moins de **22 foyers** ont fait l'objet total ou partiel d'une traçabilité amont.

Les plants atteints ont été achetés auprès de **14 établissements situés en corse du sud**, dont 12 sont encore en activité professionnelle. Les plants infectés ont été plantés entre 2000 et 2015. Les pépiniéristes ont assuré la fourniture des plants à ce jour infectés au sein de 1 et 6 foyers. La plupart des propriétaires de polygales infectés se sont approvisionnés auprès d'un seul établissement vendeur, d'autres ayant eu deux fournisseurs différents.

Si l'on examine les **fournisseurs de second niveau** ayant eux-mêmes vendu aux pépiniéristes fournisseurs directs des plants infectés, on se rend compte que 7 fournisseurs directs ont acheté les plants incriminés à des pépinières ou grossistes situés hors de Corse. Ces fournisseurs de second niveau amont se situent surtout en Italie et en Sicile (8 établissements dont 7 encore en activités), en Espagne (1 établissement) et en France avec 3 établissements dont deux situés dans le Var et 1 dans le Finistère.

Les fournisseurs de premier niveau en Corse ont acheté leurs plants, selon les cas, à 1, 2, 3 ou 4 établissements hors de Corse, certains pouvant à la fois avoir des fournisseurs de second niveau italiens et français, ou encore italiens, français et espagnols.

L'examen de l'enquête de traçabilité réalisée par la Mission des Urgences Sanitaires de la DGAL au 26 août, montre d'abord la complexité des flux de commercialisation des polygalas, certains d'entre eux étant encore plus complexes puisque des pépiniéristes français ayant approvisionné les pépiniéristes de 1^{er} niveau corses, ont eux-mêmes acquis des plants au sein d'établissements italiens. Les plants manifestant des symptômes et détectés positifs peuvent être en place depuis de nombreuses années, ce qui pose le problème important des temps de latence nécessaire à l'expression des symptômes.... beaucoup plus longs que ceux habituellement cités dans la bibliographie sur d'autres espèces végétales, et avec d'autres sous espèces de *X.f.*

Comme discuté précédemment, nous sommes enclins à écarter pour le moment l'hypothèse d'une contamination horizontale par des vecteurs infectieux du fait des attaques quasi-spécifiques sur polygales... qui ne colle pas bien avec la polyphagie des vecteurs et la valence assez étendue de la pathogénicité potentielle de la sous espèce multiplex de *X.f.*. En admettant que des vecteurs infectieux soient capables de transmettre *X.f. subsp. multiplex* depuis peu de temps avant l'expression des symptômes, on ne comprend pas bien pourquoi seules des faibles populations de polygales réparties selon un maillage assez large sur l'île seraient contaminées.

Pour vérifier l'éventuelle véracité de cette hypothèse, des études portant sur la connaissance de l'infectiosité des vecteurs potentiels de Corse, et sur les possibilités de contamination de la sous espèce *X.f. subsp. multiplex* sur les autres espèces végétales hôtes en Corse reste à faire.

La spécificité des attaques actuellement observées sur polygales nous incite à privilégier un processus de contamination pour la filière *Polygala* en particulier, qui peut survenir préférentiellement en début, et dans une moindre mesure tout au long de la filière de production des plants, mais l'action des vecteurs nécessite d'être scientifiquement écartée.

Les éléments collectés par le BNEVP : analyses et opinions

Devant cet état de faits, la BNEVP a été chargée, par la DGAL, d'évaluer plus globalement les flux de Polygales produits et vendus en France et en Europe.

Suite à de multiples entretiens de divers établissements situés à tous les niveaux de la chaîne de production et de commercialisation des polygales, l'enquête de la BNEVP permet, en grande partie, de lever le voile sur l'importance de cette espèce horticole, les acteurs présents sur les marchés français et européen et leurs pratiques.

Les polygales : une espèce de plus en plus prisée pour les aménagements d'agrément

Utilisés comme plantes à massifs, de haies, ou en plantations individuelles, la fédération nationale des métiers de jardins estiment les vente de cette espèce à plus de 150 000 plants/an.

Plantés surtout en régions méditerranéenne et sur la frange atlantique, cette plante est aussi utilisée en zone nord comme plante en conteneur de décoration maintenue en plein air pendant la belle saison et sous abris pendant la période froide.

Des circuits de production et de commercialisation extrêmement complexes

De très nombreux intervenants prennent part au processus de production, d'élevage et de mise en marché des plants

Au début de chaîne : la production de boutures et de jeunes plants par des multiplicateurs

Les boutures herbacées servant à fabriquer les jeunes plants racinés sont prélevées sur pieds mères, et bien davantage semble-t-il, sur des rameaux issus de la taille des polygales en pots ou cultivés en pleine terre au sein du même établissement, ou à l'extérieur, quelque fois sur des plantations en espaces verts. Ce bouturage est effectué surtout en février ou en octobre. Diverses publications précisent les conditions de réussite de la multiplication par bouturage (Akoumianaki-Ioannidou et al., 2000; Iapichino and Airo, 2002; Iapichino, 2004; Frangi and Nicola, 2005). Après le bouturage, les jeunes plants sont rempotés en pots de 3 litres à l'automne puis vendus l'année suivante soit 2 ans après le bouturage.

En France, l'activité de multiplication est très peu pratiquée, beaucoup moins qu'à la fin des années 2000-début 2010, et se cantonne surtout en Bretagne, essentiellement par des pépiniéristes multiplicateurs (6 établissements ont été répertoriés par la BNEVP).

La multiplication est majoritairement effectuée sur place, mais certaines entreprises achètent des plants racinés à l'extérieur pour les éléver pendant 6 mois puis les revendre à des pépiniéristes éleveurs.

L'Italie est le principal producteur de boutures et de jeunes plants, suivi de l'Espagne et du Portugal. L'Italie exporte ses jeunes plants dans les autres pays du sud, dont l'Espagne.

La grande faiblesse du système de production se situe à ce premier niveau de prélèvement des boutures. Les sources de prélèvement des boutures sont d'origines multiples, aléatoires quant aux lieux de prélèvements, sans aucune garantie sanitaire de l'état des polygales donneurs de boutures.

Les pieds mères sont cultivés sans aucune précaution sanitaire garantissant leur état indemne, et ils sont renouvelés tous les 3 à 5 ans. Les entreprises exportatrices importantes font souvent travailler à façon des petits multiplicateurs, qui vendent leurs jeunes plants directement ou après les avoir élevés jusqu'à leur état définitif de vente. Ceux-ci sont ensuite vendus, collectés puis agrégés en lots commerciaux qui empêchent toute traçabilité sanitaire possible en cas de problème et de nécessité de remontée de filière.

Conclusions

Les sources servant au bouturage et aux productions de jeunes plants sont, en l'état actuel de ce qui est connu, non sécurisées, ne répondent à aucune norme sanitaire à priori (le polygale n'est pas une espèce 'passeportisable' au sein des pays de l'U.E.) sur le plan sanitaire. Les modes de production et de commercialisation constituent potentiellement un champ favorable à la multiplication et l'extension non maîtrisée d'un éventuel fléau comme *Xylella fastidiosa*. Un simple lot commercial de polygales pourra potentiellement intégrer des plants provenant de nombreux multiplicateurs, parfois provenant de plusieurs pays, et d'une multitude de plants donneurs de boutures ayant servi à les fabriquer dont l'origine est multiple et aléatoire .

La production des plants par les pépiniéristes éleveurs et/ou éleveurs négociants

Les productions françaises de polygales (20 000 à 40 000 plants selon la BNEVP) sont dominées par les plants finis élevés à partir de jeunes plants importés surtout d'Italie, puis d'Espagne ou plus marginalement du Portugal. Ceux élevés à partir de jeunes plants produits en France sont minoritaires.

Notons que l'on peut avoir des pépiniéristes qui font de l'élevage de jeunes plants en motte achetés à l'étranger, que certains pépiniéristes français éleveurs complètent leur gamme en achetant des plants à d'autres éleveurs étrangers et que des structures commerciales intermédiaires peuvent se approvisionner les pépiniéristes éleveurs français.

- Les **producteurs français** sont situés en PACA et en Bretagne. Certains d'entre eux ont cessé la production de jeunes plants pour se consacrer à l'activité d'éleveur et de négociant.

- Les **producteurs italiens** livrant en France sont nombreux; La BNEVP a répertorié 18 établissements cités comme fournisseurs de plantes à des clients français (visités par la BNEVP) appartenant soit au négoce, à la distribution, ou à des pépiniéristes éleveurs ou éleveurs négociant. Les listes des pépiniéristes italiens susceptibles d'exporter des polygales et dont les coordonnées apparaissent sur internet, sont beaucoup plus nombreux

Ces producteurs italiens sont établis par ordre décroissant en Sicile, Toscane, Pouilles, Ligurie et Lombardie et de l'avis de la BNEVP, certains établissements situés en Toscane qui exportent en France et en Corse disposent d'une grosse activité de négoce et achètent beaucoup de plants de polygales en Sicile et dans les Pouilles. .

- Les **producteurs espagnols** qui exportent en France sont essentiellement situés en Andalousie, Almeria et dans diverses régions situées dans le sud est espagnol comme Valence, Alicante, et Murcie ou encore en Catalogne. La production de polygales est réalisée dans des entreprises bien structurée et les producteurs d'importance moyenne à grande sont intégrés au sein des circuits de négoce et de distribution.

-La **production portugaise**, est beaucoup moins importante (quantités non connues) qu'en Italie (environ 300 000 plants / an) ou en Espagne (400 000 plants / an). Plus récente que dans les autres pays, la production est répartie autour de 5 entreprises, dont une est spécialisée dans la production de jeunes plants en motte.

Les activités de négoce sont très européanisées

Il faut noter que beaucoup de producteurs étrangers assurent également les activités de négoce, avec des achats-reventes qui dépassent souvent leurs activités de production, et qui contribuent ainsi à la complexité des circuits entre pays et à leur difficile décryptage.

A ce négoce des pays producteurs, viennent se surajouter les négociants d'Europe du nord avec une activité soutenue des hollandais et belges sur le marché des polygales.

Ces derniers achètent des plants finis en Italie et en Espagne, puis redistribuent la marchandise auprès de grossistes européens, et directement aux grandes enseignes de distribution. D'autres peuvent acheter directement leur marchandise sur le grand marché européen des produits de l'horticulture d'Aalsmeer en Hollande, pour vendre à leurs clients européens. La BNEVP a aussi identifié un opérateur allemand qui commercialise également des polygales, et mentionne l'activité de courtiers spécialisés multi-cartes qui peuvent agir également dans les circuits en position intermédiaire.

Ces activités dénotent un très grand brassage des lots commerciaux qui peuvent ainsi recevoir des plants d'origine multiples quant aux lieux de production de boutures, de jeunes plants et de plants finis, pour la vente aux grands distributeurs et aux consommateurs finaux.

La vente française aux consommateurs finaux en France

Le marché français, de l'ordre de 150 000 polygales/an, est destiné aux particuliers, paysagistes aménagistes et collectivités publiques et privées. La vente des plants peut se faire en direct chez les pépiniéristes pour une infime partie, mais est assurée en grande partie par les **distributeurs professionnels** (d'après les données fournies par la Fédération nationale des métiers de jardin FNMJ)

- 55% pour les jardineries spécialisées dans les produits de jardin
- 20% pour les grandes surfaces alimentaires (GSA) et de bricolage (GSB)
- 14% pour les horticulteurs et fleuristes professionnels
- 11% pour les libres services agricoles (LISA)

Les grandes enseignes de distribution (Jardineries, GSB, GSA) achètent majoritairement les polygales en direct auprès des fournisseurs italiens et espagnols. A des fins de diversification des approvisionnements et pour répondre à des demandes imprévues, elles s'adressent à des pépiniéristes éleveurs multiplicateurs en France, ou à des négociants qui font office d'intermédiaires avec les fournisseurs de grandes zones de production italiennes et espagnoles. Ces négociants peuvent parfois stocker les plants pendant une durée de 2 à 4 mois avant la revente.

En conclusion provisoire, on peut dire que l'enquête de la BNEVP permet de mettre en évidence une grande fragilité du système de production européen vis à vis de la maîtrise du risque *Xylella* sur polygale. Dans les meilleurs des cas, les pieds mères qui font l'objet de prélèvements de bouture sont connus et identifiés, mais produits eux même et maintenus sans processus permettant de garantir la qualité sanitaire des plants. Les pires des cas représentent des productions de boutures à partir de déchets de taille issus de plants soit

présents au sein de l'établissement de multiplication, soit de plants dispersés au sein des espaces verts environnants.

Quelques plants contaminés servant de pieds mères donneurs de boutures constituent donc un pouvoir de dispersion très important, compte tenu de la complexité des circuits commerciaux, qui concerne aussi bien les jeunes plants que les plants finis. Si l'on ajoute aux risques de contamination dès la source, les risques de transmission liés aux travaux cultureaux réalisés pendant l'élevage (taille, manipulation) et à la présence d'insectes vecteurs pas forcément suivie, on peut considérer que les systèmes de production actuels semblent très défaillants vis-à-vis de la maîtrise de *Xylella*.

Les systèmes de commercialisation des plants finis peuvent contribuer à une très large diffusion des plants finis qui pourraient être atteints.

Conclusions

l'enquête de la BNEVP permet de mettre en évidence une grande fragilité du système de production européen vis à vis de la maîtrise du risque *Xylella* sur polygale.

4.2.3. Hypothèses et opinions sur les infestations de polygales en Corse

Les faisceaux de convergence actuels pour éclaircir l'origine de *X.f.* en Corse résultent à la fois de nos observations de terrain confrontées aux résultats d'analyses, des renseignements fournis par les investigations de la traçabilité amont des origines de plants infectés. L'enquête plus globale de la BNEVP a pu fournir de précieux renseignements complémentaires, tant sur la production que sur la commercialisation des polygales.

Notre analyse se base sur les données d'analyse et de traçabilité accumulées le 26 août, soit un peu plus d'un mois après la déclaration du premier foyer.

Les nombreux prélèvements à venir d'échantillons effectués sur les plantes hôtes de la sous espèce *multiplex* de *X. fastidiosa*, de même que les analyses de traçabilité des nouveaux foyers, contribueront à multiplier les résultats qui renforceront, ou au contraire annihileront notre hypothèse.

De l'ensemble des éléments exposés précédemment, en dépit des nombreuses interrogations et incertitudes qui peuvent demeurer, l'ensemble des faits et points de vue que nous retenons tendent à écarter une diffusion horizontale de la bactériose à partir de vecteurs infectieux et à opter pour une contamination verticale de la filière de production des plants de *Polygala*.

En liaison avec le point 4 et en complément de toutes les recommandations qui découleront des avis formulés liés aux points 1, 2 et 3 de la lettre de mission, nous émettons les avis suivants :

1- Au niveau de la production des jeunes plants :

- Instaurer la **délivrance du passeport phytosanitaire européen pour la commercialisation des plants de polygales** depuis la production de boutures jusqu'au plant fini destiné au client final, avec exigences spécifiques à respecter pendant les phases de production des jeunes plants. Ce passeport phytosanitaire doit garantir l'absence de *Xylella fastidiosa* sur le matériel de multiplication et imposer des tests sanitaires lors des premières phases de la production des plants.
- Etendre la délivrance du passeport phytosanitaire à l'ensemble des plantes hôtes avérées aux **sous-espèces de *Xylella fastidiosa*** établies dans les pays de l'union européenne.
- **Inciter à l'élaboration d'un règlement technique de certification sanitaire des pieds mères et plants de polygales multipliés végétativement**, et le rendre d'application obligatoire pour les producteurs de polygales, au moins dans les pays atteints par *Xylella*. Outre les tests sanitaires et les règles de production très strictes qui doivent s'appliquer au matériel initial (qui équivaut au matériel candidat assaini et conservé in-vitro) au matériel de pré-base (qui équivaut au matériel initial acclimaté in vivo, et qui concerne le plus souvent 2 générations S1 et S2), au matériel de base constitués des pieds mères issus de S1 et S2, et au matériel certifié sain issu du bouturage des pieds mères, le règlement de certification devrait permettre une garantie de traçabilité permanente des contrôles et de leurs résultats jusqu'à la production de jeunes plants.

2-Au niveau de la commercialisation des plants de polygales

-Inscrire au contrôle phytosanitaire officiel tous les producteurs et établissements revendeurs commercialisant et stockant temporairement les polygales.

-Inciter les grandes enseignes de la grande distribution des plants à se doter :

***d'un code de bonne conduite** quant aux garanties sanitaires à exiger vis-à-vis de leurs fournisseurs, et à la nécessité d'assurer les inspections des lots au moment de leur livraison par un personnel qualifié.

***d'un plan de maîtrise phytosanitaire** adapté à leurs activités, pour lutter contre les risques d'introduction et de diffusion de *Xylella*,

***d'un plan de communication** informant largement, auprès de leur clientèle, des dangers et risques liés à cette bactérie, et sur les comportements à adopter.

-Intensifier les contrôles sur les lieux de marchés de gros des végétaux (marchés d'intérêts nationaux) destinés aux professionnels de la production végétale et aux professionnels du paysage et des espaces.

3-Au niveau des actions de recherche ou de nature réglementaire à mettre en œuvre en Corse

-Enclencher une **campagne de captures massives d'insectes vecteurs potentiels** en Corse dès l'**automne 2015**, afin de consolider la liste d'espèces présentes, leur importance, leur répartition dans un premier temps, puis d'appréhender leur état éventuel d'infectiosité ensuite.

-Demander au CNBC de procéder à l'**établissement d'un état sanitaire des populations naturelles** de polygales situées dans des environnements climatiques favorables au développement de la bactériose.

-Inciter les communes de Corse à mettre en œuvre un **recensement déclaratif des possesseurs de Polygales**.

-**Interdire dans un premier temps la multiplication**, si nécessaire, **des polygales** en Corse, pour les pépiniéristes qui ne suivraient pas un règlement technique de certification des plants

-Evaluer les conséquences sanitaires, économiques et environnementales d'une **hypothèse d'interdiction de commercialisation et de plantation des polygales** en Corse

4-Au niveau de la gestion des foyers de polygales en Corse

Le caractère singulier des infections actuellement limitées à la seule espèce *Polygala* par la sous espèce multiplex de *X.f*. peut inciter le gestionnaire à **envisager des mesures proportionnées au risque actuellement présenté**, compte tenu des coûts financiers et environnementaux élevés découlant de la mise en œuvre des mesures prévues par la réglementation européenne.

Sous réserve que les foyers de la bactériose persistent à se limiter aux polygales, et sans préjudice de certaines mesures prévues par les arrêtés de la préfecture de Corse qui conservent leur pertinence, un aménagement provisoire des mesures suivantes pourraient être retenues:

Au sein des foyers:

-Les abattages des plantes, dans la zone infectée, pourraient se limiter à la totalité des polygales et à toutes autres espèces hôtes ou spécifiées présentant des symptômes douteux.

-Suite aux résultats des analyses des échantillons d'espèces hôtes et spécifiées prélevées dans l'environnement des polygales, une confirmation de l'absence de la bactérie devrait pouvoir éviter l'abattage de ces plantes.

Au sein de la zone délimitée :

-Les interdictions de sortie et tous mouvements de végétaux pourraient se limiter aux espèces végétales hôtes, au lieu de celles spécifiées. Cette interdiction pourrait prendre un **caractère temporaire**, et devrait pouvoir être levée si dans un délai raisonnable (1 an... à discuter !) les anciens foyers assainis par les arrachages n'ont pas réitéré.

-La gestion des déchets végétaux issus de l'entretien ou de l'abattage des végétaux hôtes devrait pouvoir circuler sous réserve du respect d'un **cahier des charges de bonne pratique** de la part des opérateurs, incluant notamment des opérations de désinfection des matériels et outils, de broyage des déchets, ou de confinement hermétique pendant un temps suffisant à leur dessèchement total.

5-Au niveau national

-Compléter le catalogue officiel des usages par un usage insecticide Cicadelles, ceropopes*Trnt des parties aériennes pour toutes les cultures hôtes potentielles de toutes les filières des productions agricoles susceptibles d'être attaquées par ces organismes vecteurs. Il s'agit, pour le gestionnaire, d'être en mesure de faire appliquer rapidement les mesures de lutte obligatoires en toute légalité en cas de survenue de foyers de la bactériose à *Xf.*, et dans le respect des réglementations en vigueur relatives aux résidus, à la protection des milieux, des pollinisateurs et des applicateurs.

-Mettre sur pied dans les meilleurs délais un suivi d'épidémi-o-surveillance générale des cicadelles et cercopes selon les prescriptions préconisées dans la partie 3 du rapport, afin de connaître les espèces, leur importance, leur répartition par rapport aux cultures potentiellement hôtes, données indispensables à la recherche épidémiologique et à la mise en œuvre des mesures de gestion en cas de besoin.

-Amplifier les campagnes de communication selon des contenus et supports adaptés à chacune des filières de productions agricoles et horticoles en collaboration avec les instituts techniques agricoles, et avec toutes les organisations professionnelles et associations constituées dans les domaines forestiers, non agricoles professionnel et amateur

Conclusions générales

Les principales conclusions de ce rapport sont résumées en tête de document.

Le nombre des foyers découverts depuis le 22 juillet 2015 laisse à penser que la contamination par *Xylella fastidiosa* concerne probablement l'ensemble du territoire corse, excepté les zones d'altitude supérieures.

L'arrachage et la destruction généralisés des plants de *Polygala myrtifolia* sur l'île semble un moyen envisageable afin de réduire significativement les sources d'inoculum dans l'environnement.

La citation suivante d'A. H. Purcell à propos de la lutte anti-vectorielle chimique laisse entreapercevoir toutes les limites de cette voie, soulignant ainsi les besoins de recherche :

“Chemicals, including insecticides against vectors of *Xf* have had little success for control of disease caused by *Xf*. The success of *Homalodisca vitripennis* populations outside vineyards was an exceptional success for southern California viticulture but has not worked in other regions. More effort and original thinking is clearly needed on chemical control of *Xf* in plants.” In Historical perspectives on *Xylella fastidiosa* and their relevance for the future, International symposium on the European outbreak of *Xylella fastidiosa* in olive, Gallipoli, Locorotondo, Itlay, 21-24 october 2014.

Enfin, se pose la question des **moyens, particulièrement en termes de ressources humaines**, que ce soit pour la prospection, le prélèvement, les activités analytiques, les activités de recherche à mettre en œuvre ainsi que pour la mise en œuvre des mesures de gestion. *Xylella fastidiosa* est clairement établie sur le territoire corse. Le défi que pose cette nouvelle émergence doit être pleinement relevé en assurant un travail de fond, réalisé sur la continuité, par des équipes pluridisciplinaires travaillant dans un esprit de collaboration et en synergie.

La présente expérience montre, à notre sens, **qu'il est important d'investir dans des outils génériques de bio-surveillance**, fondés sur les connaissances scientifiques, qui pourraient permettre d'anticiper l'introduction et la dispersion d'agents phytopathogènes et d'autres bioagresseurs menaçant l'agriculture européenne plutôt que de risquer de subir leurs arrivées et leurs impacts.

Références citées

- Adair, R.J., Neser, S., Stajsic, V., 2011. Phytophagous organisms associated with the woody shrub *Polygala Myrtifolia* (Polygalaceae) and their potential for classical biological control in Australia. *Plant Prot. Q.* 26, 72.
- Akoumianaki-Ioannidou, A., Kravari, E., Chronopoulos, J., 2000. Propagation of *Polygala myrtifolia* by cuttings. *Acta Hort.* 541: 265-268. *Acta Hortic.* 541, 265-268.
- Almeida, R.P.P., 2007. Glassy-winged sharpshooter transmission of *Xylella fastidiosa* to plants. *Proc. Hawaii Entomol. Soc.* 39, 83-86.
- Almeida, R.P.P., Backus, E.A., 2004. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 838-851.
- Almeida, R.P.P., Nascimento, F.E., Chau, J., Prado, S.S., Tsai, C.W., Lopes, S.A., Lopes, J.R.S., 2008. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* strains causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3690-3701.
- Almeida, R.P.P., Purcell, A.H., 2003. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera, Cicadellidae). *Jounal of Economic Entomology* 96, 265-271.
- Almeida, R.P.P., Purcell, A.H., 2006. Patterns of *Xylella fastidiosa* colonization on the precibarium of sharpshooter vectors relative to transmission to plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99, 884-890.
- Amanifar, N., Taghavi, M., Izadpanah, K., Babaei, G., 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 318-327.
- Anonyme, 2002. Incursion de la cicadelle pisseeuse *Homalodisca coagulata* en Polynésie française. Avis d'Invasion. Service de la protection des végétaux Secrétariat général de la Communauté du pacifique. N°24. 2p.
- Arzone, A., 1972. Reperti ecologici, etologici ed epidemiologici du Cicadella viridis (L.) in Piemonte (Hem. Hom. Cicadellidae). *Publicatione N°177 del centro di entomologia alpina e forestale del Consiglio nazionale delle Ricerche:* 13-38.
- Bextine, B., Blua, M., Harshman, D., Miller, T.A., 2005. A SYBR green-based real-time polymerase chain reaction protocol and novel DNA extraction technique to detect *Xylella fastidiosa* in *Homalodisca coagulata*. *J. Econ. Entomol.* 93, 667-672.
- Bextine, B., Child, B., 2007. *Xylella fastidiosa* genotype differentiation by SYBRsGreen-based QRT-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 48-54.
- Bextine, B., Tuan, S.J., Shaikh, H., Blua, M., Miller, T.A., 2004. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the glassy-winged sharpshooter. *J. Econ. Entomol.* 97, 757-763.
- Bonfils, J., Della Giustina, W., 1978. Contribution à l'étude des Homoptères Auchénorhynques. *Bulletin de la Société des sciences historiques et naturelles de la Corse* 2/3, 93-112.
- Brady, J.A., Faske, J.B., Ator, R.A., Castañeda-Gill, J.M., Mitchell, F.L., 2012. Probe-based real-time PCR method for multilocus melt typing of *Xylella fastidiosa* strains. *J. Microbiol. Methods* 89, 12-17.
- Briquet, J., de Litardière, R., 1936. Prodrome de la flore de Corse, T. II, partie 2. Lechevalier, P.
- Bull, C.T., Coutinho, T.A., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Li, X., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E., Takikawa, Y., 2014. List of new names of plant pathogenic bacteria (2011-2012). *J. Plant Pathol.* 96, 223-226.
- CABI, 2015. Crop Pest Compendium. <http://www.cabi.org/cpc>.
- Chang, C.J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., Bove, J.M., 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 27, 137-142.
- Chatterjee, S., Newman, K.L., Lindow, S.E., 2008. Cell-to-cell signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in grape. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1309-1215.
- Conrad, M., Paradis, G., 1988. *Polygala myrtifolia* L. In: Jeanmonod, D., Burdet, H.M. (Eds.), *Notes et contributions de la flore de Corse*, III. *Candollea*, 43:381.
- Cordeiroa, A.B., Sugaharaa, V.H., Steinb, B., Leite Junior, R.P., 2014. Evaluation by PCR of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* transmission through citrus seeds with special emphasis on lemons (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Crop Prot.* 62, 86-92.
- Czwienczek, E., Almeida, R.P., Bosco, D., Stanganelli, G., Gregoire, J.C., Caffier, D., Hollo, G., Mosbach-Schulz, O., Strona, G., Bragard, C., 2014. Extensive literature search to build a database on the host range of *Xylella fastidiosa*. International Symposium on the European Outbreak of *Xylella fastidiosa* in Olive, Gallipoli (Lecce)-Locorotondo (Bari), Italy.
- Daugherty, M.P., Almeida, R.P.P., 2009. Estimating *Xylella fastidiosa* transmission parameters: decoupling sharpshooter number and feeding period. *Entomol. Exp. Appl.* 132, 84-92.

- Daugherty, M.P., Bosco, D., Almeida, R.P.P., 2009. Temperature mediates vector transmission efficiency: inoculum supply and plant infection dynamics. *Ann. Appl. Biol.* 155, 361-369.
- Davis, M.J., Purcell, H.A., Thompson, S.V., 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199, 75-77.
- De Miranda, M.P., Lopes, J.R.S., Do Nascimento, A.S., Dos Santos, J.L., Cavichioli, R.R., 2009. Survey of sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) associated with *Xylella fastidiosa* transmission in Citrus groves of the North Coast of Bahia State. *Neotrop. Entomol.* 38, 827-U825.
- de Souza, A.A., Cristofani-Yaly, M., Della Coletta-Filho, H., Machado, M.A., 2014. Some approaches aiming at citrus variegated chlorosis control in Brazil. International Symposium on the European Outbreak of *Xylella fastidiosa* in Olive, Gallipoli (Lecce)-Locorotondo (Bari), Italy.
- de Souza, A.A., Ionescu, M., Baccari, C., da Silva, A.M., Lindow, S.E., 2013. Phenotype overlap in *Xylella fastidiosa* is controlled by the cyclic di-GMP Phosphodiesterase eal in response to antibiotic exposure and diffusible signal factor-mediated cell-cell signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3444-3454.
- de Souza, A.A., Takita, M.A., Amaral, A.M., Della Coletta-Filho, H., Machado, M.A., 2009. Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent de citrus variegated chlorosis. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2, 957-964.
- de Souza, A.A., Takita, M.A., Della Coletta-Filho, H., Campos, M.A., Teixeira, J.E., Targon, M.L.P., Carlos, E.F., Ravasi, J.F., Fischer, C.N., Machado, M.A., 2007. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genet. Mol. Biol.* 30, 965-971.
- Della Coletta-Filho, H., Carvalho, S.A., Silva, L.F.C., Machado, M.A., 2014. Seven years of negative detection results confirm that *Xylella fastidiosa*, the causal agent of CVC, is not transmitted from seeds to seedlings. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 593-596.
- Della Coletta-Filho, H., Pereira, E.O., Souza, A.A., Takita, M.A., Cristofani-Yale, M., Machado, M.A., 2007. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange× Murcott tangor. *Plant Pathol. (Oxf.)* 56, 661-668.
- Doddapaneni, H., Francis, M., Yao, J., Lin, H., Civerolo, E.L., 2007. Genome-wide analysis of *Xylella fastidiosa*: implications for detection and strain relationships. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 55-66.
- Drosopoulos, S., Asche, M., 1991. Biosystematic studies on the spittlebug genus *Philaenus* with the description of new species. *Zool. J. Linn. Soc.* 101, 169-177.
- EFSA, 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 2015;13(1):3989.
- Elbeaino, T., Yaseen, T., Valentini, F., Ben Moussa, I.E., Mazzoni, V., D'onghia, A.M., 2014. Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 328-332.
- Elith, J., Phillips, S.J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y.E., Yates, C.J., 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Divers. Distrib.* 17, 43-57.
- Fadel, A.L., Stuchi, E.S., de Carvalho, S.A., Federici, M.T., Della Coletta-Filho, H., 2014. Navelina ISA 315: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. *Crop Prot.* 64, 115-121.
- Fournier, P., 1961. Les quatres flores de France. Lechavalier, P., Paris.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H., Civerolo, E.L., 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 115, 203-213.
- Frangi, P., Nicola, S., 2005. Proc. VthIS on New Flor. Crops. In: Tombolato, A.F.C., Dias-Tagliacozzo, G.M. (Eds.), *Acta Hortic.*
- Franklin, J., 2009. Mapping Species Distributions: Spatial Inference and Prediction. Cambridge University Press.
- Freitag, J.H., 1951. Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology* 41, 920-934.
- Gamisans, J., Jeanmonod, D., 1993. Catalogue des plantes vasculaires de la Corse (éd. 2). Compléments au Prodrome de la Flore Corse, annexe n°3. Conservatoire et Jardin botaniques Genève, p. 258.
- Giampetrucci, 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 Announc* 3, e01538-01514.
- Gmitter Jr, F.G., Chen, C., Machado, M.A., de Souza, A.A., Ollitrault, P., Froehlicher, Y., Shimizu, T., 2012. Citrus genomics. *Tree Genet. Genomes* 8, 611-626.
- Hail, D., Mitchell, F., Lauzière, I., Marshall, P., Brady, J., Bextine, B., 2010. Detection and analysis of the bacterium, *Xylella fastidiosa*, in glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis*, populations in Texas. *Journal of Insect Science* 10, 168.

- Harper, S.J., Ward, L.I., Clover, G.R.G., 2010 erratum 2013. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 12, 1282-1288.
- Hartung, J.S., Nian, S., Lopes, S., Ayres, A.J., Bransky, R., 2014. Lack of evidence for transmission of *Xylella fastidiosa* from infected sweet orange seed. *J. Plant Pathol.*, 497-506.
- He, C.X., Li, W.B., Ayres, A.J., Hartung, J.S., Miranda, V.S., Teixeira, D.C., 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Dis.* 84, 622-626.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Shelley, L.B., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270, 313-321.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A., 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25, 1965-1978.
- Hill, B.L., Purcell, A.H., 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85, 209-212.
- Hill, B.L., Purcell, A.H., 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87, 1197-1201.
- Hopkins, D.L., 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. *Phytopathology* 75, 713-717.
- Iapichino, G., 2004. Improved micropropagation in *Polygala myrtifolia*. *Vitro cell. dev. biol. - Plant* 40, 86-89.
- Iapichino, G., Airo, M., 2002. Esperienze sulla propagazione in vitro di *Polygala myrtifolia*. *Italus Hortus* 3, 54-56.
- Ionescu, M., Zaini, P.A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A.M., Lindow, S.E., 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3910-E3918.
- Janse, J.D., Valentini, F., Purcell, A.H., Almeida, R.P.P., 2012. Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts - *Xylella fastidiosa*. *J. Plant Pathol.* 94 (1, Suppl.), S147-S154.
- Killiny, N., Martinez, R.H., Dumenyo, C.K., Cooksey, D.A., Almeida, R.P.P., 2013. The exopolysaccharide of *Xylella fastidiosa* is essential for biofilm formation, plant virulence, and vector transmission. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 1044-1053.
- Kontkanen, P., 1950. Quantitative and seasonal studies on the leafhopper fauna of the field stratum on open areas in North Karelia. *Ann. Zool. Soc. Zool-Bot. Fenn. 'Vanamo'* 13, 1-91.
- Krell, R.K., Boyd, E.A., Nay, J.E., Park, Y.L., Perring, T.M., 2007. Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 211-216.
- Krugner, R., Backus, E.A., 2014. Plant water stress effects on stylet probing behaviors of *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) associated with acquisition and inoculation of the bacterium *Xylella fastidiosa*. *J. Econ. Entomol.* 107, 66-74.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier.
- 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. *J. Plant Pathol.* 96, 7-14.
- Lopes, J.R., Daugherty, M.P., Almeida, R.P., 2009. Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. *Entomol. Exp. Appl.* 131, 216-224.
- Marucci, R.C., Lopes, J.R.S., Cavichioli, R.R., 2008. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in Coffe and Citrus. *J. Econ. Entomol.* 101, 1114-1121.
- Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R.M.V.B.C., Stall, R.E., 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84, 456-461.
- Mitchell, F.L., Brady, J., Bextine, B., Lauzière, I., 2009. Seasonal increase of *Xylella fastidiosa* in Hemiptera collected from central Texas vineyards. *J. Econ. Entomol.* 102, 1743-1749.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notomi, T., 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* 59, 145-157.
- Newman, K.L., Almeida, R.P., Purcell, A.H., Lindow, S.E., 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1737-1742.
- Niza, B., Coletta-Filho, H.D., Merfa, M.V., Takita, M.A., de Souza, A.A., in press. Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. *Plant Pathol. (Oxf.)*.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2189-2200.
- Paião, F., Meneguim, A., Casagrande, E., Leite, R., 2002. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. *Fitopatol. Bras.* 27, 67.
- Paradis, G., 1987. Contribution à l'étude de la flore de Corse, notamment dans le région d'Ajaccio. *Le monde des plantes* 429-430, 26-27.
- Paradis, G., 2004. Observations sur les stations de l'espèce subspontanée *Polygala myrtifolia* L. à l'ouest d'Ajaccio (Corse). *Bulletin de la société botanique du centre-ouest - Nouvelle série* 35, 91-102.
- Parker, J.K., Havird, J.C., de La Fuente, L., 2012. Differentiation of *Xylella fastidiosa* strains via multilocus sequence analysis of environmentally mediated genes (MLSA-E). *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1385-1396.
- Payne, K., 1981. A comparison of the catches of Auchenorrhyncha (Homoptera) obtained from sweep netting and pitfall trapping. *Entomologist's Monthly Magazine* 117, 215-223.
- Pérez Sierra, A., Alvarez, L.A., Henricot, B., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2006. *Cylindrocladium pauciramosum* causes root and collar rot of *Polygala myrtifolia* in Spain. *Plant Pathology* 55, 298.
- Pignatti, S., 1982. *Flora d'Italia*, vol.2. Edagricole, Bologna.
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2, 2-11.
- Polizzi, G., Crous, P.W., 1999. Root and collar rot of milkwort caused by *Cylindrocladium pauciramosum*, a new record for Europe. *European Journal of Plant Pathology* 105, 413-415.
- Puissant, S., 2006. Contribution à la connaissance des cigales de France : géonémie et écologie des populations (Hemiptera, Cicadidae). Association pour la Caractérisation et l'Etude des Entomocénose.
- Puissant, S., Sueur, J., 2001. Contribution à l'étude des cigales de Corse (Hemiptera, Cicadidae). *Bull. Soc. Entomol. Fr.* 106, 429-436.
- Purcell, A.H., 1980. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. *J. Econ. Entomol.* 73, 834-838.
- Purcell, A.H., 1981. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce's disease in European grape cultivars. *Phytopathology* 71, 429-435.
- Purcell, A.H., 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: Harris, K. (Ed.), *Adv. Dis. Vector Res.* Springer-Verlag, New York, pp. 243-266.
- Purcell, A.H., Finlay, A., 1979. Evidence for non-circulative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology* 69, 393-395.
- Redak, R.A., Purcell, A.H., Lopes, J.R., Blua, M.J., Mizel, R.F.r., Andersen, P.C., 2004. The biology of Xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu. Rev. Entomol.* 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.
- Rodas, V., 1994. Convivencia com a clorose variegada dos citros. *Laranja* 15, 129-134.
- Rogers, E.E., Backus, E.A., 2014. Anterior foregut microbiota of the glassy-winged sharpshooter explored using deep 16S rRNA gene sequencing from individual insects. *PLoS ONE* 9, e106215.
- Rosetti, V., Garnier, M., Bové, J.M., Beretta, M.J., Teixeira, A.R.R., Quaggio, J.A., De Negri, J.D., 1990. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 310, 345-349.
- Saponari, M., Boscia, D., Loconsole, G., Palmisano, F., Savino, V., Potere, O., Martelli, G.P., 2014a. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain coDIRO in Apulia. *J. Plant Pathol.* 96, 611.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R.K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G.P., Krugner, R., Porticelli, F., 2014b. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J. Econ. Entomol.* 107, 1316-1319.
- Scally, M., Schuenzel, E.L., Stouthamer, R., Nunney, L., 2005. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8491-8499.
- Schuenzel, E.L., Scally, M., Stouthamer, R., Nunney, L., 2005. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3832-3839.
- Severin, H.H.P., 1949. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. *Hilgardia* 19, 190-202.
- Severin, H.H.P., 1950. Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. II. Life history and virus transmission. *Hilgardia* 19, 357-382.

- Simpson, A.J.G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M.C., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S., Barros, M.H., Bonaccorsi, E.D., Bordin, S., Bove, J.M., Briones, M.R.S., Bueno, M.R.P., Camargo, A.A., Camargo, L.E.A., Carraro, D.M., Carrer, H., Colauto, N.B., Colombo, C., Costa, F.F., Costa, M.C.R., Costa-Neto, C.M., Coutinho, L.L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A.P., Ferreira, A.J.S., Ferreira, V.C.A., Ferro, J.A., Fraga, J.S., Franca, S.C., Franco, M.C., Frohme, M., Furlan, L.R., Garnier, M., Goldman, G.H., Goldman, M.H.S., Gomes, S.L., Gruber, A., Ho, P.L., Hoheisel, J.D., Junqueira, M.L., Kemper, E.L., Kitajima, J.P., Krieger, J.E., Kuramae, E.E., Laigret, F., Lambais, M.R., Leite, L.C.C., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Lopes, S.A., Lopes, C.R., Machado, J.A., Machado, M.A., Madeira, A., Madeira, H.M.F., Marino, C.L., Marques, M.V., Martins, E.A.L., Martins, E.M.F., Matsukuma, A.Y., Menck, C.F.M., Miracca, E.C., Miyaki, C.Y., Monteiro-Vitorello, C.B., Moon, D.H., Nagai, M.A., Nascimento, A., Netto, L.E.S., Nhani, A., Nobrega, F.G., Nunes, L.R., Oliveira, M.A., de Oliveira, M.C., de Oliveira, R.C., Palmieri, D.A., Paris, A., Peixoto, B.R., Pereira, G.A.G., Pereira, H.A., Pesquero, J.B., Quaggio, R.B., Roberto, P.G., Rodrigues, V., Rosa, A.J.D., de Rosa, V.E., de Sa, R.G., Santelli, R.V., Sawasaki, H.E., da Silva, A.C.R., da Silva, A.M., da Silva, F.R., Silva, W.A., da Silveira, J.F., Silvestri, M.L.Z., Siqueira, W.J., de Souza, A.A., de Souza, A.P., Terenzi, M.F., Truffi, D., Tsai, S.M., Tsuhako, M.H., Vallada, H., Van Sluys, M.A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A.L., Zago, M.A., Zatz, M., Meidanis, J., Setubal, J.C., *Xylella fastidiosa* Consortium, O., 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406, 151-157.
- Stancanelli, G., Almeida, R.P.P., Bosco, D., Caffier, D., Czwienczek, E., Gregoire, J.-C., Hollo, G., Mosbach-Schulz, O., Parnell, S., Bragard, C., 2015. Assessing the risk posed to plant health by *Xylella fastidiosa* in the European Union. "watch letter" - Vol. 33, no.33, p. 1-8 CIHEAM : the International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (Paris).
- Standen, V., 2000. The adequacy of collecting techniques for estimating species richness of grassland invertebrates. *J. Appl. Ecol.* 37, 884-893.
- Stewart, A.J.A., 2002. Techniques for sampling Auchenorrhyncha in grasslands. *Denisia* 04, zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums Neue Folge 176, 491-512.
- Su, C.-C., Chang, C.J., Chang, C.-M., Shih, H.-T., Tzeng, K.-C., Jan, F.-J., Kao, C.-W., Deng, W.-L., 2013. Pierce's disease of grapevines in Taiwan: Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 161, 389-396.
- Thellung, A., 1911. Notes sur quelques plantes vivaces et frutescentes spontanées ou naturalisées sur le littoral de la Provence et en Corse. *Bull. Acad. Int. Géogr. Bot.* 21, 215.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3, 877-882.
- Törmälä, T., 1982. Evaluation of five methods of sampling field arthropods, particularly the leafhopper community in grassland. *Ann. Entomol. Fenn.* 48, 1-16.
- Wang, N., Li, J.L., Lindow, S.E., 2012. Rpff-dependent regulon of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 102, 1045-1053.
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.-Y., Weisburg, W.G., Mandelco-Paul, L., Brenner, D.J., 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37.
- Young, D.A., 1968. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. *Bulletin of the United States National Museum*, Washington 261, 1-287.
- Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R., Nunney, L., 2010. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology* 100, 601-611.
- Yurtsever, S., 2000. On the polymorphic meadow spittlebug, *Philaenus spumarius* (L.) (Homoptera: Cercopidae). *Turk. J. Zool.* 24, 447-459.
- Zhang, J.X., Lashomb, J., Gould, A., Hamilton, G., 2011. Cicadomorpha insects associated with bacterial Leaf Scorch infected oak in Central New Jersey. *Environ. Entomol.* 40, 1131-1143.

Annexes

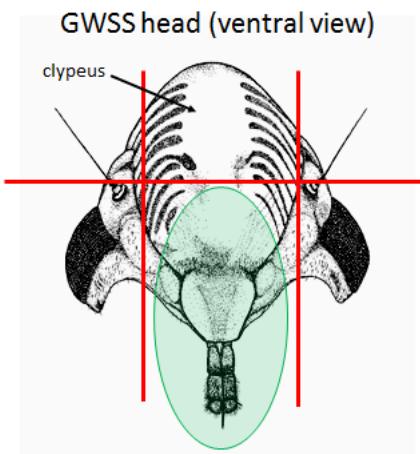
Annexe 1. Etat de l'art sur les méthodes moléculaires utilisées pour la détection et l'identification des souches de X. fastidiosa dans des insectes vecteurs

Il est important de souligner que **les méthodes de détection de *Xylella fastidiosa* ont d'abord été mises en place sur des plantes contaminées, voire plutôt sur des isolats bactériens cultivés à partir de plantes contaminées** afin de d'affranchir de possibles inhibiteurs de PCR (Janse et al., 2012). **Les premières tentatives pour transférer ces méthodes à la détection de la bactérie dans des vecteurs potentiels se sont soldées par des échecs** (Bextine et al., 2004). Ces échecs ont été attribués à i) la faible concentration de bactéries dans les tissus d'insecte ii) la difficulté à extraire l'ADN de la bactérie à partir des tissus d'insecte, iii) la présence d'inhibiteurs dans les tissus insectes (Bextine et al., 2004). Depuis, quelques travaux ont été publiés, mais la majorité des études portent toujours sur la détection à partir de plantes contaminées. Très peu de vecteurs ont été étudiés, la grande majorité des études a été réalisée sur des vecteurs nord-américains, avec un focus particulier (historique) sur *Homalodisca vitripennis*. **Aucune étude n'a tenté jusqu'à présent de développer un outil qui permette à la fois d'identifier le vecteur et la sous-espèce/souche de *X. fastidiosa* transportée.**

On cherche ici à recenser les méthodes existantes (ou les plus prometteuses) qui permettent (permettraient) de détecter la présence de *Xylella fastidiosa* dans un insecte hôte mais aussi d'identifier précisément la sous-espèce voire la souche présente. On ne dressera donc pas une revue exhaustive de tout ce qui a été tenté pour identifier des isolats bactériens ou des colonies présentent dans des tissus quels qu'ils soient (voir (Doddapaneni et al., 2007; Janse et al., 2012) pour des revues récentes).

Point 1 : l'extraction d'ADN.

Il existe un consensus relatif sur le fait qu'au moins la tête voire (mieux) le précibarium et le cibarium doivent être isolés par dissection avant de procéder à l'extraction (Bextine et al., 2005; Elbeaino et al., 2014; Rogers and Backus, 2014; Saponari et al.), l'ablation des yeux et du maximum de chitine est préconisé afin d'exclure les inhibiteurs de PCR qu'ils contiennent (R. Krugner, USDA, USA, *comm pers.* Voir figure ci-dessous). Certains auteurs arrivent toutefois à des résultats satisfaisants (mise en évidence de la bactérie et caractérisation de la sous-espèce) en partant de l'insecte entier (Francis et al., 2006; Mitchell et al., 2009; Harper et al., 2010 erratum 2013; Brady et al., 2012) ce qui diminue considérablement le temps de préparation avant extraction.



Vue ventrale d'une tête d'*Homalodisca vitripennis* montrant la zone à prélever (pre-cibarium/cibarium) avant extractoin (en vert) [schéma fourni par R. Krugner, USDA, USA)

Il n'y a pas de consensus quant à la méthode d'extraction d'ADN. Des kits adaptés pour les plantes sont parfois utilisés pour extraire l'ADN des insectes vecteurs (Harper et al., 2010 erratum 2013; Elbeaino et al., 2014). Lorsque plusieurs méthodes sont comparées (Bextine et al., 2004), la meilleure est le kit « Qiagen DNeasy Blood and Tissue ». On notera que cette méthode a été validée comme la meilleure méthode d'extraction disponible pour les insectes et les bactéries, dans le cadre du projet Européen FP7 QBoL (<http://www.qbol.org/en/qbol.htm>) qui visait au développement d'outils diagnostiques de type barcodes pour l'identification des organismes de quarantaine en Europe)

Point 2 : la détection de *Xylella* et la caractérisation de la (des) sous-espèce(s) / souche(s) présente(s).

Trois grands types de méthodes ont été testées : 1) la PCR quantitative (qPCR) 2) l'amplification isothermale (LAMP « loop-mediated isothermal amplification ») 3) l'amplification par PCR suivie de séquençage.

[*Nota PCR = Polymerase chain reaction, ou réaction en chaîne par polymérase, il s'agit d'une méthode très classique de biologie moléculaire pour l'amplification in vitro de fragments d'ADN grâce à une enzyme et des amorces spécifiques des fragments ciblés*]

Pour chacune de ces méthodes, des efforts ont été faits afin de dessiner des amorces spécifiques de *Xylella fastidiosa* afin d'éviter les faux positifs, voire de cibler des gènes pour lesquels certaines mutations signent l'appartenance à une sous-espèce donnée. Le séquençage de plusieurs génomes (7 génomes complets pour *X. fastidiosa fastidiosa, pauca, multiplex, sandyi, morus* et 12 génomes partiels disponibles <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/173>) a largement contribué à la mise au point de méthodes fiables. Les gènes ciblés sont variés (16S, gyrB, rimM, ITS, gènes de ménage etc. (Doddapaneni et al., 2007; Janse et al., 2012).

1) **la PCR quantitative (qPCR, appelée aussi PCR en temps réel).** C'est la méthode actuellement la plus utilisée. Très brièvement, le principe est de mesurer, à chaque cycle

d'amplification du marqueur ciblé, la quantité de produit d'amplification généré grâce à un marqueur fluorescent. On peut donc suivre en temps réel l'évolution de la quantité d'ADN présente dans la réaction (par opposition à la PCR classique où le produit d'amplification est seulement détecté à la fin de la réaction). Grâce à la cinétique de la réaction on peut obtenir une idée de la quantité initiale d'ADN cible (dans notre cas celui de *Xylella*). Il existe deux grands types de méthodes pour la détection des amplicons, tous deux ont été utilisés pour la détection de *X. fastidiosa* dans des vecteurs.

1.1) Les **agents intercalants fluorescents non spécifiques** (e.g. SYBR®Green), utilisé par divers auteurs (Bextine et al., 2005; Bextine and Child, 2007; Hail et al., 2010; Rogers and Backus, 2014) pour quantifier du 16S, ou de la gyrB. Cette approche a cependant une limite : les agents s'intercalent dans tous les fragments double brins d'ADN, pas seulement l'amplicon, ce qui peut perturber la quantification (e.g. le marqueur peut s'intégrer dans les dimères d'amorces). Certains auteurs complètent donc leur protocole en ajoutant une étape à la suite de la réaction de qPCR qui permet de tracer des courbes de fusion par l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu en ré-augmentant la température par palier afin de détecter si plusieurs modes existent (e.g. Bextine et al., 2005 ; Fig 3). La température de fusion des amplicons (T_m) est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de la courbe de fusion. La T_m est spécifique d'un amplicon donné. Certains auteurs ont donc essayé de sélectionner des couples d'amorces ciblant des fragments d'ADN pour lesquels les T_m seraient différentes en fonction de la sous-espèce de *Xylella* présente dans le vecteur (Bextine et al., 2005; Bextine and Child, 2007; Hail et al., 2010) (sous-espèces testées *X. fastidiosa fastidiosa*, *multiplex*, *sandyi*). Ces études commencent à dater. Aucune n'a pris en compte l'ensemble des sous-espèce actuellement connues et les auteurs s'accordent à dire que cette technique ne devrait pas être utilisée comme seul élément pour la différenciation des sous-espèces / souches de *X. fastidiosa*.

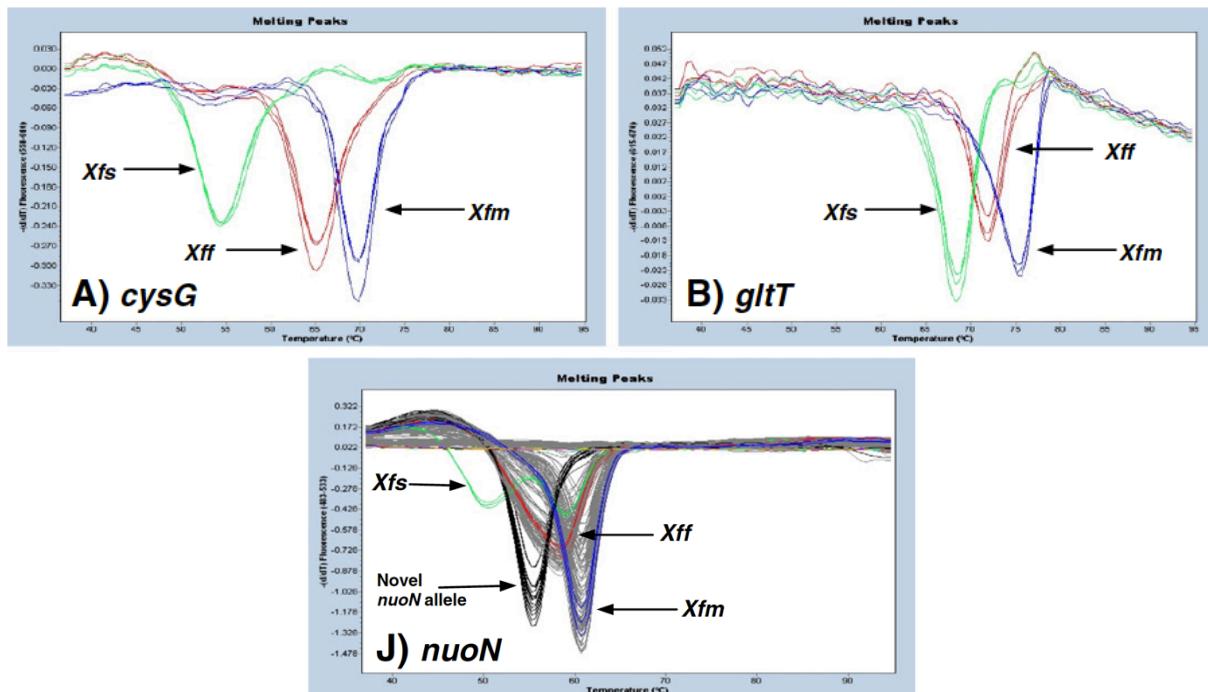
1.2) L'utilisation de **sondes spécifiques marquées par des fluorochromes**. Cette approche est plus spécifique que la précédente. Il existe plusieurs types de technologies utilisant des sondes, deux ont été utilisés en ce qui concerne la détection de *X. fastidiosa* dans les vecteurs.

i) Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman sont utilisées par Francis et al. (2006), Mitchell et al. (2009) et Harper et al. (2010 erratum 2013) pour suivre l'amplification d'un fragment de gène d'une protéine anonyme, d'ITS, ou du gène rimM respectivement. Dans ce cas, des sondes spécifiques de la région cible sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) (Poitras and Houde, 2002). Le fluorochrome suppresseur inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la qPCR, si la région cible est présente (i.e. dans notre cas si *Xylella* est présente) la sonde s'hybride sur la cible et est hydrolysée par la polymérase au moment de l'amplification de la cible. Le reporter est séparé du suppresseur et émet alors un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, qui peut être mesuré au moment de l'elongation (plus il y a de sondes hydrolysées, donc de cibles, plus la fluorescence est importante). Dans ce cas, la spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde. L'émission de fluorescence non spécifique due à des

mésappariements ou des dimères d'amorce comme ce peut être le cas dans le cas d'agents intercalants non spécifiques est donc réduite. Cependant, le risque d'avoir de faux négatifs est plus élevé car des mutations dans la région de la cible reconnue par la sonde risquent d'entraîner un défaut d'hybridation : la cible n'est donc pas détectée. Les 4 sous espèces *X. fastidiosa sandyi*, *X. fastidiosa fastidiosa*, *X. fastidiosa multiplex* et *X. fastidiosa pauca* sont mises en évidence par les deux études mais il apparaît que le gène rimM utilisé par Harper et al. (2010 erratum 2013) amplifie mieux les isolats testées que la zone du génome ciblée par Francis et al. (2006). On note également qu'Harper et al. (2010 erratum 2013) parviennent pas à mettre en évidence par qPCR la présence de l' « espèce » proche de *X. fastidiosa* mise en évidence sur *Pyrus pyrifolia* à Taiwan, que ce soit avec leurs amorces ou celles de Francis et al. (2006), alors qu'ils y parviennent en PCR classique avec l'un des premier couple d'amorces développé (Minsavage et al., 1994)). Les auteurs ayant mis au point la méthode pour la détection (présence / absence) de *Xylella fastidiosa* toutes sous-espèces confondues dans les tissus hôtes ne cherchent pas à la pousser plus loin pour tenter une caractérisation (i.e. détection de plusieurs cibles à la fois en utilisant différentes sondes) .

ii) l'hybridation de deux sondes est utilisée par Brady et al. (2012) pour développer un typage multilocus rapide des souches de *Xylella*, grâce à la comparaison de courbes de fusion. Deux sondes, dont l'une est porteuse (en 3') d'un fluorochrome émetteur et l'autre (en 5') d'un fluorochrome accepteur sont utilisées (Poitras and Houde, 2002). Les sondes sont choisies pour s'hybrider à leurs cibles tout en n'étant séparées que de 1 à 5 bases. Lorsque les sondes sont séparées, le fluorochrome donneur émet un bruit de fond de fluorescence. Lorsqu'elles sont hybridées à moins de 10 nucléotides de distances, la proximité des 2 fluorochromes permet le transfert de l'énergie du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur et provoque l'émission fluorescente de ce dernier. On mesure alors l'acquisition de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée. Comme les sondes ne sont pas hydrolysées (contrairement à la méthode précédente TaqMan), il est possible de réaliser des courbes de fusion en fin de réaction qui vont être utilisées pour le typage. A noter que si ce type de sonde est classiquement relativement cher, Brady et al. (2012) s'attachent à diminuer au maximum les coûts en utilisant des fluorochromes peu onéreux. Ces auteurs dessinent des sondes sur des zones cibles dans lesquels des mutations signant l'appartenance sub-spécifique existent. Les sondes ainsi dessinées possèdent des températures de fusion qui sont différentes en fonction du variant de *Xylella* qui est présent. Les courbes de fusion permettent donc d'identifier la sous-espèce contenue dans le vecteur (voir figure ci-dessous). Les régions ciblées par les auteurs sont les 7 gènes de ménage inclus dans les génotypages classiques MLST (Yuan et al., 2010) plus l'ITS, pilU et nuoN. Les sous-espèces inclus dans le test sont *X. fastidiosa sandyi*, *X. fastidiosa fastidiosa*, *X. fastidiosa multiplex* (*pauca* n'est pas incluse). A noter que les auteurs ne sont pas parvenus à mettre au point des sondes fonctionnelles pour malF, petC, and pilU mais suggèrent que la gyrB utilisée par Mitchell et al., (2009) pourrait compléter le test. Pour montrer l'efficacité de leur approche, les auteurs insistent sur un des résultats de leur étude : la mise en évidence au sein de certains vecteurs insectes (93 insectes testés, appartenant à 7 espèces) d'un nouveau variant génétique de nuoN non répertorié à l'époque dans la base MLST (<http://pubmlst.org>) et confirmé par séquençage (voir figure ci-dessous). Là encore les auteurs insistent sur le fait

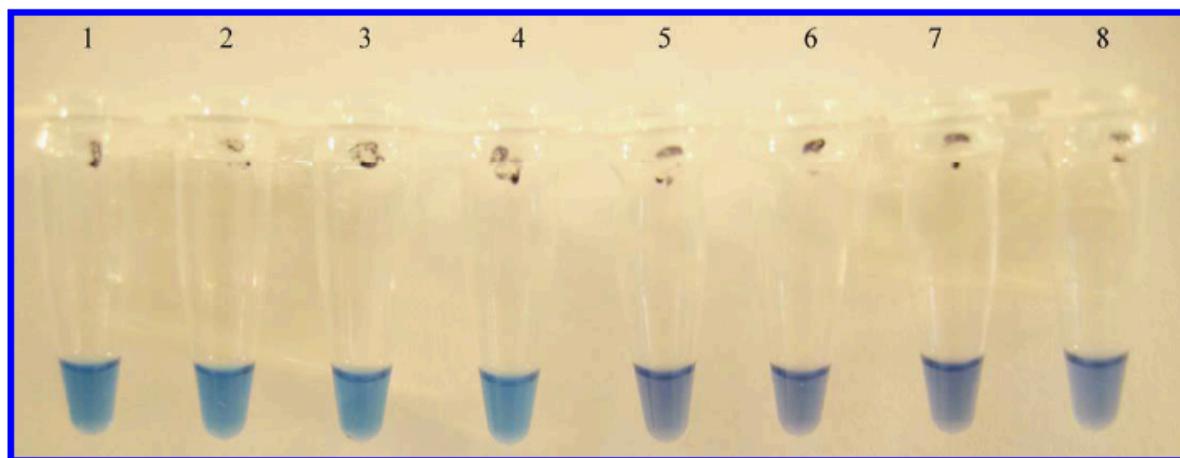
que ce type de test ne remplace pas les efforts de séquençage mais peut les diriger rapidement et à moindre coût étant donné que les loci sont ceux utilisés dans une analyse de génotypage classique.



Courbes de fusion montrant les différences de Tm entre sous-espèces de *X. fastidiosa* pour les régions cibles cysG (A) et gltT (B). La figure du bas montre les courbes de fusion pour les 93 insectes analysés (courbes grises) pour la région nuoN. Un nouveau variant (courbes noires) est mis en évidence. (extrait de Brady et al., 2012, Fig. 2) Xfs = *X. fastidiosa sandyi*, Xff = *X. fastidiosa fastidiosa*, Xfm = *X. fastidiosa multiplex*

2) l'amplification isothermale médiée par des boucles (LAMP « loop-mediated isothermal amplification »). Cette méthode initialement développée par Notomi et al.,(2000) permet l'amplification spécifique d'un fragment cible à une température constante (ainsi aucun thermocycleur n'est requis contrairement à la PCR). Quatre à six amores sont utilisées pour cibler la zone d'intérêt et permettre la création de boucles d'hybridation. La réaction repose sur une polymérase possédant une activité de déplacement du brin complémentaire (voir Figure 1 de Tomita et al., (2008) pour les détails). L'amplification du fragment cible peut être révélée par des tests colorimétriques (Mori et al., 2004). L'intérêt principal de cette méthode est qu'elle peut être utilisée dans des laboratoires ne disposant pas d'équipements coûteux, qu'elle est rapide (résultats obtenus en 1h) et très spécifique. La méthode LAMP a été adaptée à la détection de *X. fastidiosa* par Harper et al., (2010 erratum 2013) (voir figure ci-dessous). Le gène ciblé est le même que pour leur tests en qPCR, à savoir rimM. La méthode est testée sur *Graphocephala atropunctata* (nombre d'insectes testés non précisés, pas de témoin négatif sain, infection par *X. fastidiosa fastidiosa*) ainsi que de nombreuses plantes hôtes (contaminées par *X. fastidiosa sandyi*, *X. fastidiosa fastidiosa*, *X. fastidiosa multiplex*, *X. pauca* et « l'espèce » taiwanais). La méthode LAMP permet de détecter les 4 sous-espèces de *Xylella*, la bactérie est bien détectée dans les vecteurs. Comme pour l'approche en qPCR l'« espèce » proche de *X. fastidiosa* mise en évidence sur *Pyrus pyrifolia* à Taiwan n'est pas

détectée. La méthode apparaît comme plus sensible que la PCR classique pour la détection de *Xylella* (250 copies du gène *rimM* peuvent être détectées) mais moins que la qPCR (10 copies). Les auteurs concluent que cette méthode est acceptable pour un premier niveau de détection mais qu'elle doit être accompagnée par une autre méthode sous peine de ne pas détecter la bactérie lorsque sa concentration est trop faible ou l'ADN endommagé. Toujours selon ces auteurs, 50 échantillons pourraient être analysés sur le terrain en 2h ce qui représente le grand avantage de cette méthode. Cela étant, d'après les premiers tests de l'ANSES cette méthode possède un seuil de détection médiocre.



Avec la méthode LAMP développée par Harper et al., (2010) pour le gène *rimM*, la présence de *X. fastidiosa* est révélée par un changement de couleur du milieu réactionnel (violet pour les négatifs 5-8 et bleu pour les positifs 1-4) (extrait de Harper et al., (2010, Fig. 2)

3) l'amplification par PCR suivie de séquençage. C'est la seule méthode qui permet actuellement de détecter *X. fastidiosa* et d'identifier précisément la sous-espèce / souche incriminée. Plusieurs marqueurs ont été ciblés. Actuellement la méthode reconnue pour le génotypage des souches est l'amplification et le séquençage de fragments de 7 gènes de ménage. A l'origine 10 marqueurs avaient été testés (*holC*, *nuoL*, *leuA*, *gltT*, *cysG*, *petC*, *malF*=*lacF*, *nuoN*, *rfbD*, *pilU*) (Scally et al., 2005), 7 ont été optimisés (*holC*, *nuoL*, *leuA*, *gltT*, *cysG*, *petC*, *malF*) et retenus dans les tests classiques (Yuan et al., 2010), deux (*pilU*, *nuoN*) ainsi que la *gyrB* sont souvent séquencés en complément par les auteurs. Dans le cadre d'une approche dite de MLST « MultiLocus Sequence Typing », chaque souche est identifiée par son profil allélique (ie la combinaison des allèles présent pour chaque loci, chaque allèle étant représenté par un numéro les profils sont centralisés dans une base commune <http://pubmlst.org> ce qui permet d'optimiser les recherches. Dans le cadre d'une approche dite MLSA « MultiLocus Sequence Analysis » ce sont les séquences complètes des différents loci qui sont concaténées et analysées afin de positionner la souche dans un arbre phylogénétique. L'ensemble des sous-espèces et souches peuvent être détectées et caractérisées par les méthodes de MLSA (e.g. (Almeida et al., 2008; Nunney et al., 2013)). Pour accéder à des variations plus fines du génome afin par exemple de détecter l'apparition de variants lors d'un suivi épidémiologique, il est par contre nécessaire d'adopter une autre approche dite de MLVA « Multiple Loci VNTR Analysis ; VTRN= Variable Number of Tandem Repeats » c'est à dire une technique de typage moléculaire basée sur l'analyse de plusieurs loci

présentant des séquences répétées. La variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem est analysé afin d'identifier le groupe d'appartenance. Un des avantages des méthodes de séquençage et d'analyse de multiples loci est que les recombinants peuvent également être détectés. Jusqu'à maintenant, le séquençage de ces marqueurs a été réalisé par des méthodes classiques de type Sanger qui ne permettent pas un typage à très haut débit.

Annexe 2 : Liste des vecteurs potentiels de Xylella fastidiosa en Europe

Les espèces françaises sont colorées en rouge

[F] = espèces françaises continentales, [C] = espèces françaises corses

* nouvelle citation de Corse (espèce récoltée pendant la mission)

52 de ces espèces sont connues de France, et 11 de Corse

Aphrophoridae

1. *Aphrophora alni* (Fallen, 1805) [F, C]
2. *Aphrophora corticea* (Germar, 1821) [F]
3. *Aphrophora major* Uhler, 1896 [F]
4. *Aphrophora pectoralis* Matsumura, 1903 [F, C*]
5. *Aphrophora salicina* (Goeze, 1778) [F]
6. *Aphrophora similis* Lethierry, 1888
7. *Aphrophora willemsi* Lallemand, 1946
8. *Lepyronia coleoptrata* (L., 1758) [F, C]
9. *Mesoptyelus petrovi* (Grigoriev, 1910)
10. *Neophilaenus albipennis* (F., 1798) [F]
11. *Neophilaenus angustipennis* (Horvath, 1909)
12. *Neophilaenus campestris* (Fallen, 1805) [F]
13. *Neophilaenus exclamacionis* (Thunberg, 1784) [F]
14. *Neophilaenus infumatus* (Haupt, 1917) [F]
15. *Neophilaenus limpidus* (Wagner, 1935)
16. *Neophilaenus lineatus* (L., 1758) [F, C]
17. *Neophilaenus longiceps* (Putton, 1895) [F]
18. *Neophilaenus minor* (Kirschbaum, 1868) [F]
19. *Neophilaenus modestus* (Haupt, 1922)
20. *Neophilaenus pallidus* (Haupt, 1917)
21. *Paraphilaenus notatus* (Mulsant & Rey, 1855) [F]
22. *Peuceptyelus coriaceus* (Fallen, 1826)
23. *Philaenus italosignus* Drosopoulos & Remane, 2000
24. *Philaenus loukasi* Drosopoulos & Asche, 1991
25. *Philaenus maghresignus* Drosopoulos & Remane, 2000
26. *Philaenus signatus* Melichar, 1896
27. *Philaenus spumarius* (L., 1758) [F, C]
28. *Philaenus tarifa* Remane & Drosopoulos, 2001
29. *Philaenus tessellatus* Melichar, 1899

Cercopidae

30. *Cercopis arcuata* Fieber, 1844 [F]
31. *Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868 [F]
32. *Cercopis sabaudiana* Lallemand, 1949 [F]
33. *Cercopis sanguinolenta* (Scopoli, 1763) [F]

34. *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 [F]
35. *Haematoloma dorsata* (Ahrens, 1812) [F]
36. *Triecphorella geniculata* (Horvath, 1881) [F]

Cicadellidae

37. *Ledra aurita* (L., 1758) [F, C]
38. *Cicadella viridis* (L., 1758) [F, C]
39. *Cicadella lasiocarpae* (Ossiannilsson, 1981) [F]
40. *Graphocephala fennahi* (Young, 1977) [F]
41. *Evacanthus acuminatus* (F., 1794) [F]
42. *Evacanthus interruptus* (L., 1758) [F]
43. *Evacanthus rostagnoi* (Picco, 1921) [F]
44. *Anoterostemma ivanoffi* (Lethierry, 1876) [F]
45. *Errhomenus brachypterus* Fieber, 1866 [F]

Cicadidae

46. *Cicada barbara* ssp. *barbara* (Stål, 1866)
Cicada barbara ssp. *lusitanica* Boulard, 1982
47. *Cicada cretensis* Quartau & Simões, 2005
48. *Cicada mordoganensis* Boulard, 1979
49. *Cicada orni* Linné, 1758 [F, C]
50. *Cicadatra alhageos* (Kolenati, 1857)
51. *Cicadatra atra* (Olivier, 1790) [F]
52. *Cicadatra glycyrrhizae* (Kolenati 1857)
53. *Cicadatra hyalina* (F., 1798)
54. *Cicadatra hyalinata* (Brullé, 1832)
55. *Cicadatra icari* Simões, Sanborn & Quartau, 2013
56. *Cicadatra karpathoensis* Simões, Sanborn & Quartau, 2013
57. *Cicadatra persica* Kirkaldy, 1909
58. *Cicadatra platyptera* Fieber, 1876
59. *Cicadatra querula* (Pallas, 1773)
60. *Lyristes gemellus* Boulard ,1988
61. *Lyristes plebejus* (Scopoli, 1763) [F]

Tibicinidae

62. *Aestuansella aestuans* (Fabricius 1794)
63. *Cicadetta albipennis* Fieber, 1876
64. *Cicadetta anapaistica* ssp. *anapaistica* Hertach 2011
Cicadetta anapaistica ssp. *lucana* Hertach 2015
65. *Cicadetta brevipennis* Fieber, 1876 [F]

66. *Cicadetta cantilatrix* Sueur & Puissant, 2007 [F]
 67. *Cicadetta caucasica* Kolenati, 1857
 68. *Cicadetta cerdaniensis* Puissant & Boulard, 2000 [F]
 69. *Cicadetta concinna* ssp. *concinna* Germar, 1821
Cicadetta concinna ssp. *arachnocepta* Gogala, Trilar & Krpač, 2014
 70. *Cicadetta dirfica* Gogala, Trilar & Drosopoulos, 2011
 71. *Cicadetta fangoana* Boulard, 1976 [C]
 72. *Cicadetta hageni* Fieber, 1872
 73. *Cicadetta hannekeae* Gogala, Drosopoulos & Trilar, 2008
 74. *Cicadetta iphigenia* Emeljanov, 1996
 75. *Cicadetta kissavi* Gogala, Drosopoulos & Trilar, 2009
 76. *Cicadetta macedonica* Schedl, 1999
 77. *Cicadetta mediterranea* Fieber, 1876
 78. *Cicadetta montana* (Scopoli, 1772) [F]
 79. *Cicadetta olympica* Gogala, Drosopoulos & Trilar, 2009
 80. *Cicadetta sibillae* Hertach 2015
81. *Cicadivetta carayoni* Boulard, 1982
 82. *Cicadivetta flaveola* (Brullé, 1832)
 83. *Cicadivetta goumenissa* Gogala, Drosopoulos & Trilar, 2012
 84. *Cicadivetta tibialis* (Panzer 1798) [F]
85. *Euboeana castaneivaga* Gogala, Trilar & Drosopoulos, 2011
86. *Euryphara contentei* Boulard, 1982
 87. *Euryphara dubia* (Rambur, 1840)
 88. *Euryphara undulata* (Waltl, 1837)
89. *Hilaphura varipes* (Waltl 1837)
90. *Melampsalta lobulata* Fieber, 1876
91. *Pagiphora annulata* (Brullé, 1832)
 92. *Pagiphora aschei* Kartal, 1978
93. *Pseudotettigetta melanophrys* ssp. *melanophrys* (Horvath, 1907)
Pseudotettigetta melanophrys ssp. *leunami* (Boulard, 2000)
94. *Saticula coriaria* Stål, 1866
95. *Tettigetta dimissa* (Hagen, 1856)
 96. *Tettigetta musiva* (Germar, 1930)
 97. *Tettigetta prasina* (Pallas, 1773)
98. *Tettigettacula baenai* (Boulard, 2000)
99. *Tettigettalna aneabi* (Boulard, 2000)
 100. *Tettigettalna argentata* (Olivier 1790) [F]
 101. *Tettigettalna armandi* Puissant, 2010
 102. *Tettigettalna boulardi* Puissant, 2010

103. *Tettigettalna defauti* Puissant, 2010
 104. *Tettigettalna estrellae* (Boulard, 1982)
 105. *Tettigettalna helianthemi* ssp. *helianthemi* (Rambur, 1840)
Tettigettalna helianthemi ssp. *galantei* Puissant, 2010
 106. *Tettigettalna josei* Boulard, 1982
 107. *Tettigettalna mariae* (Quartau & Boulard, 1995)
108. *Tettigettula pygmea* (Olivier 1790) [F]
109. *Tibicina cisticola* (Hagen, 1855) [F]
 110. *Tibicina corsica* ssp. *corsica* (Rambur, 1840) [C]
Tibicina corsica ssp. *fairmairei* Boulard, 1980 [F]
 111. *Tibicina garricola* Boulard, 1983 [F]
 112. *Tibicina haematodes* ssp. *haematodes* (Scopoli, 1763) [F]
Tibicina haematodes ssp. *helveola* (Germar, 1821)
Tibicina haematodes ssp. *viridinervis* Fieber, 1876
 113. *Tibicina nigronervosa* Fieber, 1876 [C]
 114. *Tibicina picta* (Fabricius, 1794) [F]
 115. *Tibicina quadrisignata* (Hagen, 1855) [F]
 116. *Tibicina steveni* (Krynicki, 1837) [F]
 117. *Tibicina tomentosa* (Olivier, 1790) [F]
118. *Tympanistalna distincta* (Rambur, 1840)
 119. *Tympanistalna gastrica* (Stål, 1854)

Annexe 3 : Lettre de mission



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORêt

**Direction générale de l'alimentation
Service des actions sanitaires en production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
Bureau des semences et de la santé des végétaux**
Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15

M. Marc Mortureux
Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)
14, rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

M. François Houllier
Institut national de recherche agronomique (INRA)
147, rue de l'Université
75007 Paris

Réf. interne : BSSV / 2015 - 0707

Paris, le 31/07/2015

Objet : Lettre de mission d'expertise sur *Xylella fastidiosa* en Corse du 3 au 11 août 2015

A la suite de la première détection en Corse le 22/07/2015 de *Xylella fastidiosa* sur végétaux de *Polygala myrtifolia* en pleine terre, nous sollicitons une expertise in-situ du Laboratoire de la Santé des Végétaux de l'ANSES ainsi que de l'Institut national de recherche agronomique (INRA). Vous m'avez indiqué que M. Bruno Legendre et M. Jean-François Germain de l'ANSES, et que Mme Astrid Cruaud et M. Jean-Yves Rasplus de l'INRA, pourraient participer à cette mission.

Les experts désignés ci-dessus interviendront dans le cadre de la présente lettre de mission, et sous le pilotage du chef de mission M. Gilbert Chauvel (référent expert national cultures ornementales, MAAF). Il s'agit d'une mission d'expertise in-situ dans l'objectif de formuler des recommandations sur le dispositif régional, national ainsi que sur les besoins à développer en terme de connaissance scientifique. Cette mission doit servir de préfiguration à des travaux collaboratifs plus larges et à plus long terme entre Anses et INRA sur la bactérie, *Xylella fastidiosa*, étant donnés vos champs de compétences synergiques.

Dans ce contexte, nous vous demandons :

1/ d'appuyer les services de l'Etat sur place dans le cadre de l'enquête épidémiologique sur l'origine du foyer

- Appui méthodologique au prélèvement d'échantillons et à la capture d'insectes vecteurs ;
- Appui à l'analyse épidémiologique de la situation et appui à l'interprétation des données recueillies par les services en charge de la protection des végétaux sur la détermination de l'origine du foyer. Propositions d'exploitations possibles de ces données recueillies. Recommandations sur le formatage des données recueillies en vue de leur partage éventuel dans le cadre de projets de recherche à venir, ou de groupe de travail de la plate-forme d'épidémiiosurveillance en santé végétale.

2/ d'analyser les insectes connus pour être vecteurs pour identifier s'ils sont contaminés et aptes à transmettre la bactérie :

- Prélèvements d'insectes susceptibles d'être vecteurs, en vue du développement de la méthode par l'ANSES permettant de détecter la bactérie sur ces insectes, et de l'analyse à haut-débit d'un grand nombre d'individus de vecteurs développée par l'INRA ;
- Stockage approprié des individus collectés et des ADN extraits de ces spécimens pour de futures investigations par les équipes ANSES et INRA;

- Initiation d'un travail scientifique en commun (ANSES, INRA) sur l'évaluation de l'aptitude à la transmission de la bactérie par les insectes vecteurs prélevés en zone délimitée ou identifiés au point 3/ et en fonction du point précédent.

3/ d'acquérir une meilleure connaissance des vecteurs potentiels dans le cadre de recherches à moyen terme :

- Travail bibliographique de recherche de populations importantes d'insectes vecteurs potentiels sur plantes spécifées en région Corse qui pourraient être source à l'avenir d'un développement épidémiologique exponentiel ;
- Identification des réseaux d'interactions potentielles entre plantes hôtes de la maladie et vecteurs potentiels ;
- Avis sur la mise en place d'une surveillance exhaustive en Corse, voire en France, du groupe cigales, cicadelles et cercopes. Le cas échéant, recommandation et propositions de mise en œuvre pour un tel dispositif (collecte d'insecte à réaliser à grande échelle et dans la durée, par différentes méthodes).

4/ de déterminer, au regard de la situation locale, s'il est pertinent de prendre en compte certains facteurs de risques spécifiques en vue de prévenir la diffusion de la maladie :

- Initiation d'une analyse des risques liés aux principaux flux de végétaux de la Corse vers la France métropolitaine ou autres pays et des risques qui pourraient y être associés ;
- Initiation d'une analyse du risque lié à la commercialisation de *Polygala myrtifolia* (modes de production, flux, ...).

Ces deux points pourront faire le cas échéant l'objet d'études ultérieures en fonction des premiers éléments mis en lumière par la mission d'expertise.

Le groupe d'experts pourra notamment être amené à faire des recommandations sur les besoins en terme de recherche, en vue du développement de nouveaux outils nécessaires à la lutte contre cette bactérie.

Une visite du laboratoire d'analyse de Corte sera programmée, au cours de laquelle l'ANSES évaluera également l'aptitude éventuelle du laboratoire à répondre aux critères d'un laboratoire agréé pour les analyses *Xylella*.

Tout prélèvement d'échantillon réalisé sur site se fera avec l'aval du DRAAF/SRAL Corse, et sera mis en commun entre ANSES et INRA pour leur exploitation future.

Les experts ainsi désignés ne peuvent communiquer en externe (médias, etc) les avancées et les résultats de la mission qu'après validation au préalable par le MAAF.

Une réunion de cadrage sera réalisée en début de mission par le préfet. Les experts non présents en Corse au moment de cette réunion de cadrage participeront néanmoins par téléphone ou visioconférence. Les éléments recueillis au cours de cette mission devront permettre un rendu sous la forme d'un rapport à rendre au MAAF avant le 31/08/2015. Un rapport intermédiaire est attendu pour le 15/08/2015. La diffusion éventuelle de tout ou partie du rapport sera laissée à l'appréciation du MAAF. Une restitution en fin de mission par M. Gilbert CHAUVEL des premières observations et conclusions post-terrain pourra être organisée par le Préfet.

En cas de difficulté rencontrée dans l'accomplissement de cette mission, je vous prie de m'en informer dans les meilleurs délais.

Mes services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire. Je vous remercie de bien vouloir m'accuser réception de la présente demande.



Le Directeur Général de l'Alimentation,
Patrick DEHAUMONT

Annexe 4 : Calendrier de la mission

Dimanche 2 août 2015

08h10 : Arrivée BL - V 72202 - Hôtel Kallisté, 51 cours Napoléon, Ajaccio (arrivée à 12h suite transfert via Bastia)

17h05 : Arrivée JFG - V 72835 - Hôtel Kallisté, 51 cours Napoléon, Ajaccio

Participation aux opérations de désinsectisation sur Porticcio et Bastelicaccia. Observation d'un *Polygala myrtifolia* non recensé à Bastelicaccia (AP, JFG, BL).

Lundi 3 août 2015

07h30-12h00 : Déplacement sur le site de la zone artisanale de Propriano et au village de vacances de Porticcio. Opération de recensement exhaustif et d'identification de la flore du village vacances.

BL + JFG + AP + FREDON, CBNC et DREAL

Capture d'insectes et recherche de symptômes sur plantes, échanges avec le directeur de la FREDON (Michael Lecat) et la directrice du CBNC (Laetitia Hugot).

14h30 : Arrivée GC - AF 4764 - Hôtel Kallisté, 51 cours Napoléon, Ajaccio.

15h : Réunion de cadrage avec M. le Préfet de Corse, DRAAF-SRAL, DDCSPP 2A, et en visio-conférence avec la DGAL et l'INRA.

16h30 : Réunion DRAAF-SRAL, DDCSPP2A, FREDON.

17h-19h : Réunion inter-services en Préfecture.

Mardi 4 août 2015

7h30-11 :00 : Visite sur le terrain à Porticcio (8h00) chez un particulier avec observation de 2 pieds de *Polygala myrtifolia* agés d'une 15aine d'années. Jardin paysagé environné par le maquis. Identification de la flore sur le site, prélèvement sur plantes symptomatiques et asymptomatiques. Capture d'insectes sur le site.

11h00-12 :30 : Visite de la pépinière Rivière sur la commune de Porticcio avec observation d'un lot de 9 *Polygala myrtifolia* faiblement symptomatiques (non recensés) réceptionnés en avril 2014 en provenance d'une pépinière (Vannucci Plante) de la région de Pistoia (Italie). Prélèvements par la FREDON.

14h30- 16h30 : Site désinsectisé à Albitreccia avec prélèvements: GC, BL, JFG, AP, le directeur de la Fredon Corse (Mr Lecat) et le directeur de la lutte anti-vectorielle (Monsieur Yves Alphonsi). Capture d'insectes. Observation de *Polygala myrtifolia* non recensés dans la zone résidentielle.

Réunion de l'équipe d'experts en DRAAF (17h-19h) : étude de la lettre de cadrage et examen contenu prévisionnel du rapport avec répartition du travail rédactionnel.

17h00-19 :30 : Réunion des missionnaires à la DRAAF (cadrage de la mission – point d'étape) (GC, JFG, BL).

Mercredi 5 août 2015

7H30 - 13h00 : GC + BL + JFG + AP : Visite du laboratoire de l'Université de **Corte** sous la conduite de Mme LUCIANI avec échanges en salle de réunion à l'INRA. Rencontre du président du centre de recherche de l'INRA de Corte (M. François Casabianca) : présentation des pistes de recherche envisagées par l'INRA en Corse.

15h00 – 16h00 : Visite sur le terrain proche d'Ajaccio (La Parata) d'une zone naturelle présentant une population naturalisée de *Polygala myrtifolia*.

16 :00-17h00 : Visite du site de la Chapelle des Grecques à Ajaccio avec prélèvements sur micocouliers et pêcher symptomatiques.

18h00 - 19h00: Point téléphonique sur la mission DGAL-ANSES.

17h00- Arrivée missionnaires de l'INRA : JYR et AC – AF 7568..

20h00- 23h00 : Dîner de travail avec l'ensemble des missionnaires DGAL-ANSES-INRA et DRAAF, Mme Agnès Poirier (chef de SRAL) et M. Pierre Ehret (expert national DGAL) pour informations réciproques sur état de la mission et poursuite de la mission par INRA des 08 au 11-08-2015.

Jeudi 6 août 2015

7h30 - 13h00 : Réunion et formation à Corte sur les vecteurs potentiels. Présence de l'ensemble des missionnaires, chef de SRAL avec les entomologistes de Corse : représentants de l'Office de l'environnement de Corse, de l'AREFLEC, du CBNC, de la DREAL (Mme Laëtitia Hugot), de l'INRA de Corte (M. F. Casabianca) etc.

Rencontre avec l'animatrice inter-filière de la Chambre régionale d'agriculture et M. Fieschi, Président de l'APFEC (association des fruits d'été) et président du pôle végétal de la Chambre d'Agriculture 2B.

16h00- 18h00 : visite de terrain à Péri d'un site avec *Polygala myrtifolia* infectés et Amandiers à proximité. Prélèvements de faune potentiellement vectrice (JYR, AC et FREDON).

17h00-19h30 : réunion de travail à la DRAAF et rédaction d'un document de synthèse sur les premiers éléments résultant de la mission d'expertise à destination de Monsieur le Préfet.

Vendredi 7 août 2015

9h00-12h30 : réunion à la préfecture : présentation par Monsieur le préfet de l'équipe de la mission d'expertise *Xylella fastidiosa* aux représentants des organisations professionnelles. Présentation de quelques éléments résultants de la mission par le chef de mission et par les missionnaires. Présence de la presse locale (Corse Matin).

12h30-13h30 : déjeuner de travail des missionnaires pour la programmation de la fin de mission INRA et discussions sur le rapport définitif et intermédiaire (plan du rapport avec résumés points abordés).

14h25 : Départ GC - AF 4451.

17h10 : Départ BL - AF 4447.

14h30- 18h00 : visite terrain des missionnaires INRA (JYR, AC) et JFG, avec prélèvements d'échantillons sur *Polygala* et espèces hôtes potentiels de la souche *multiplex* dans l'environnement.

Samedi 8 août 2015

11h50 : Départ JFG - V 72834

9h-21h Visite terrain AC et JYR environs de Propriano, zones humides, prélèvements d'insectes hôtes potentiels.

Dimanche 9 août 2015

9h-21h Visite terrain AC et JYR environs de Propriano, zones humides, prélèvements d'insectes hôtes potentiels.

Lundi 10 août 2015

10h-12h : Visite chez un particulier (AC, JYR, Agnès Poirier, Pierre Ehret, Michaël Lecat), prélèvements d'échantillons sur *Polygala* et espèces hôtes potentiels souche multiplex dans l'environnement

13h-21h : Visite terrain AC et JYR environs d'Ajaccio, zones humides, prélèvements d'insectes hôtes potentiels.

Mardi 11 août 2015

Matinée : AC, JYR, travail sur le rapport

12h30 déjeuner de travail AC, JYR, Sylvie Malézieux, Agnès Poirier et Pierre Ehret pour débriefing de fin de mission de terrain.

15h15 : Départ JYR et AC – AF4507.

Annexe 5. Méthodes recommandées pour l'échantillonnage d'insectes vecteurs potentiels de X. fastidiosa

1. Méthodes manuelles, instantanées pour la capture des Cicadelles et Aphrophores

i) Le fauchage (filet fauchoir) (technique utilisée lors de la mission)

Le filet fauchoir est un type particulièrement robuste de filet qui permet de déloger les insectes de la végétation et de les capturer. **L'anneau qui maintient le tissu formant le filet et dans lequel sont capturés les insectes doit être renforcé** pour résister aux contacts répétés avec les plantes (il peut être constitué de fibres naturelles ou synthétique).

	
Filet fauchoir (62€ chez http://www.natureanimenvironnement.com/)	Filet à ouverture triangulaire (32€ chez http://www.entosphinx.cz/)

Le mode d'action le plus efficace est d'effectuer un mouvement de va et vient à travers la végétation en avançant en ligne droite à une vitesse constante. Le nombre de coups lors de ce balayage peut être fixé et constant pour comparer les aires de capture. Kontkanen (1950) estime que 200 coups de fauchoir sont nécessaires pour une bonne estimation du spectre des espèces présentes dans une prairie.

Après chaque série de coups, il faut bien faire attention à replier le sac de réception sur l'anneau métallique pour en obstruer l'ouverture et éviter que les espèces les plus mobiles ne s'échappent. Pour autoriser cette manipulation la longueur du sac doit au moins être égale à une fois et demie le diamètre de l'ouverture.

A la fin du fauchage, les insectes capturés peuvent être extraits du sac en utilisant un aspirateur à bouche ou le contenu entier peut être versé dans un sac collecteur ou un récipient permettant de tuer les insectes.

Le filet fauchoir est certainement la méthode la plus largement utilisée pour collecter des insectes phytophages sur la végétation.

Il présente de nombreux avantages : peu coûteux, il est facile et rapide à utiliser, un grand nombre d'insectes peut être capturé et il permet de couvrir de vastes étendues de végétaux.

Pour ces raisons il est largement utilisé pour des études non quantitatives par exemple pour réaliser des inventaires faunistiques.

Parmi ses facteurs limitants :

- Il n'est pas utilisable sur végétation humide, écrasée ou trop rase.
- Si les coups de fauchoir sont trop vigoureux, la végétation peut être endommagée, ce qui est un inconvénient quand il s'agit de plantes cultivées.
- Il ne convient pas sur des plantes trop grande ou trop robustes (culture à végétation haute ou arbres). Dans ces conditions il peut être remplacé par l'utilisation du parapluie japonais.

Le paramètre le plus important est la taille et la forme de l'ouverture. **Les filets à grande ouverture peuvent permettre d'échantillonner un gros volume de végétation mais ils sont lourds et encombrant. Les modèles avec des ouvertures plus étroites récoltent moins de matériel mais présentent l'avantage de restreindre les fuites possible d'insectes. Les filets à ouvertures triangulaires permettent un fauchage très près du sol.**

D'autres biais peuvent venir du récolteur avec des variations dans la vitesse, la hauteur et l'angle d'attaque du filet fauchoir au moment de la frappe, l'action du vent peut également intervenir.

Avec des filets à ouverture ronde, ce sont surtout les espèces présentes dans les couches moyennes et supérieures qui seront capturées, celles plus près du sol seront sous-représentées.

La réaction des espèces à la perturbation de leur environnement sera différente selon qu'elles sont très mobiles (échappement par le vol) ou sédentaires (auront tendance à se laisser tomber), d'où une sous-représentation possible de certaines espèces.

Si la technique du fauchoir doit être utilisée pour réaliser des estimations de populations, les sources de biais doivent être minimisées en utilisant une procédure standardisée définissant l'aire couverte, le nombre total de coups de filet, la hauteur du filet au moment de l'impact sur la plante, le rythme de la marche.

ii) Le battage (parapluie japonais)

La méthode consiste à donner des coups de bâton sur le feuillage d'un arbre ou d'un arbuste pour faire tomber les insectes sur un support placé dessous (parapluie japonais). Il faut donner des coups brusques dirigés verticalement de haut en bas (3 à 4). La parapluie japonais ou nappe de battage est un carré de tissu blanc tendu sur une croix en bois ou métal que l'on place sous les branches battues. **C'est le complément du filet fauchoir pour les strates de végétation les plus élevées.**



Parapluie japonais (59€ chez <http://www.natureanimenvironnement.com/>)

iii) L'aspirateur à bouche

C'est l'accessoire indispensable en complément de l'utilisation d'un filet fauchoir ou d'un parapluie japonais. Il en existe de grandes variétés de forme et de prix.

Il est important que le réservoir tubulaire soit transparent pour pouvoir contrôler ce qui est capturé pendant l'aspiration. Les tubes en verre sont plus fragiles mais restent translucides comparés à des tubes en plastique plus résistant mais qui peuvent se rayer et devenir rapidement opalescent.



Aspirateurs à bouche (11€ chez <http://www.nature-et-passion.com/>)

iv) Le piège à succion D-Vac

Il s'agit d'utiliser un fort courant d'air généré par un ventilateur motorisé pour extraire les insectes de la végétation. Le plus communément utilisé est le D-Vac. Il comprend une unité de ventilation alimentée par un moteur, il permet d'aspirer les insectes qui sont recueillis dans une chambre de réception. Comme les insectes ne passent pas à travers le ventilateur, ils restent en bon état, ce qui rend leur identification réalisable.

La buse d'aspiration est placée verticalement sur la végétation pour un temps standard (au moins 20s), les insectes aspirés dans la chambre de réception peuvent ensuite être transférés dans un récipient pour être tués et stockés.

Le grand avantage de cette technique est qu'il permet de standardiser les prélèvements. Comme la section de la bouche d'aspiration est connue (souvent 0,1m²), il est habituel de réaliser 10 'succions' pour avoir un échantillonnage sur 1m².

L'ouverture de la buse d'aspiration fait 0,1m²

Le D-Vac est souvent la méthode préférée pour les prairies ou les végétations basses comparée au fauchage ou à l'utilisation de pièges ou d'assiettes colorées. Son usage est limité par la hauteur de la végétation.

Il existe une version modifiée G-Vac avec une section de buse de 0,01m² à l'efficacité comparable. Le second étant cependant plus performant pour les espèces proches du sol.

Tous les types de piège à succion ramassent des débris végétaux, particules du sol et autres débris. Ce qui consommera du temps pour faire le tri d'avec les insectes (c'est la partie la plus consommatrice de temps de cette méthode).

Il présente la plupart des avantages/inconvénient du fauchage au filet mais nécessite un investissement initial important.



Piège D-Vac <http://www.rinconvitova.com/d-vac.htm> (Les prix vont de 995 à 2800€ chez Rincon-Vitova)

2. Méthodes automatiques, en continu, pour la capture des Cicadelles et Aphrophores

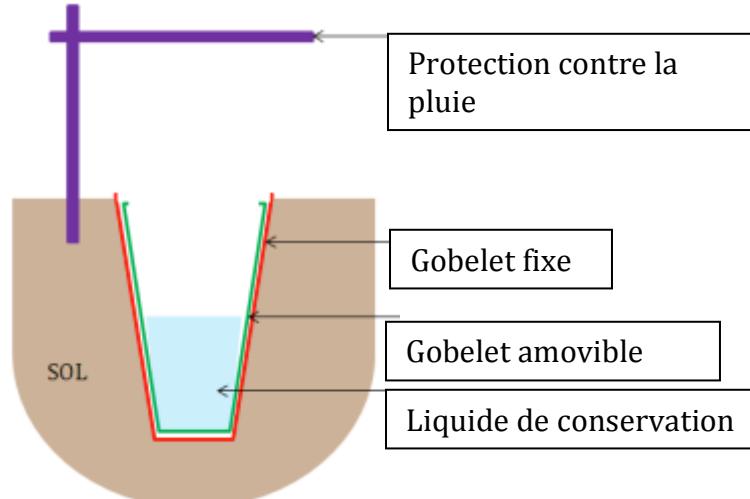
i) Les pièges Barber

Les pièges Barber sont deux récipients collecteurs imbriqués l'un dans l'autre, en verre, métal ou plastique, typiquement de 8 à 10 cm de diamètre et 10 cm de profondeur qui sont enfouis dans le sol, leur ouverture affleurant à la surface du sol. **Ils contiennent un liquide de conservation.**

Les invertébrés qui sont actifs à la surface du sol ou dans la couche épigée peuvent chuter dans le piège et ne peuvent s'en échapper se noyant dans un liquide de conservation. Le design du réceptacle a peu d'importance tant que son ouverture est située juste en dessous de la surface du sol pour permettre la chute des insectes.

Le liquide de conservation de base est constitué d'un mélange d'eau saturée en sel avec un agent mouillant (un liquide vaisselle, peu onéreux, suffit). L'agent mouillant fait tomber les insectes directement au fond du piège. La conservation des insectes pour l'identification morphologique est assurée par le sel mais pour une durée maximum d'une semaine, fréquence à laquelle il faut relever le piège. Pour une conservation plus longue, il est possible d'utiliser du 'propanediol' à 10%.

Leur intérêt est qu'ils ne sont pas chers, faciles à installer et permettent de capturer un large spectre d'espèces. Ils permettent un échantillonnage continu dans le temps sur de longue période, donnant une meilleure image que les méthodes instantanées que sont le fauchage ou l'utilisation de D-Vac. Ils peuvent donner accès aux espèces qui sont dans les strates les plus basses de la végétation inaccessible aux autres méthodes d'échantillonnage.



<http://www.amentsoc.org/insects/glossary/terms/pitfall-trap>

<http://www.supagro.fr/>

Pièges Barber

ii) Les panneaux chromo-attractif jaune

Les pièges constitués de plaques engluées (plaques en carton ou en plastiques couvertes sur l'une ou les deux faces d'une substance adhésive qui résiste à l'eau et qui reste collante sur de longues périodes). Le double-face est à privilégier. Les panneaux englués peuvent faire 10X15 cm ou 20X50 cm doubles-faces.

Il existe pratiquement autant de protocoles que d'expérimentateurs, à titre d'exemple on peut retenir celui proposé par le guide d'observation et de suivi des organismes nuisibles en zones non agricoles :

Selon la taille de la plante, placer les panneaux verticalement à :

-plante mesurant <1m : 20cm au-dessus du feuillage,

-plante mesurant de 1 à 1,5m : 1 m du sol,

-plante mesurant > 1,5 m : 1,5 m du sol.

La densité de panneaux utilisés variera en fonction de la surface de la parcelle suivie :

<200m² : 1 panneau

200 à 500 m² : 2 panneaux

500-1000m² : 3 panneaux

>1000m² : 4 panneaux.

Les panneaux sont à répartir sur l'ensemble de la parcelle, avec si possible un contrôle par semaine. Le piège est à changer dès que le comptage est rendu difficile.

Leur gros inconvénient est que les insectes capturés sont englués, difficile à extraire et restent rarement intacts sur la plaque. Ce qui peut rendre leur identification morphologique problématique.

Néanmoins, ils sont largement utilisés comme une technique peu coûteuse pour la surveillance de la distribution et de la propagation des populations de cicadelles dans les cultures commerciales. Par exemple, **ils ont été l'une des principales méthodes d'échantillonnage des cicadelles vectrices de la maladie X-disease en Californie (Purcell & Elkington, 1980).**



Pièges à glue, <http://www.royalbrinkman.fr/> (De 19,25 les 25 à 277€ les 1000 chez Rincon-Vitova)

3. Cas particulier des cigales

D'une manière générale pour les cigales, la technique préconisée est l'utilisation de pièges lumineux mais parmi les espèces présentes en France, très peu sont piégées de cette façon et dans la plupart des cas il s'agit de femelles (Puissant, com. pers.). La méthode la plus efficace reste la chasse à vue avec une capture manuelle. Les spécialistes du groupe utilisent la cymbalisation (chants des mâles) pour les repérer puis les capturer au filet.

Annexe 6. Recommandations pour la conservation des insectes en vue de leur identification morphologique, de l'amplification PCR et du séquençage de leur ADN (et éventuellement de celui de Xylella spp.)

Une fois les insectes capturés, il est recommandé de les tuer soit en les plongeant directement dans l'éthanol 75% soit en utilisant de l'éther acétique (un petit papier imbibé d'éther peut par exemple être glissé dans l'aspirateur à bouche ; e.g. Sigma-Aldrich Ref. 270989-2L).

Pour une bonne conservation de l'ADN, l'éthanol utilisé ne doit contenir aucun aditifs (pas d'alcool ménager, ni d'alcool à brûler, dilution à l'eau osmosée. E.g. Baeckeroot Labo Ref. CE528151).

On préfera l'éthanol 75% plutôt que l'éthanol pur pour le stockage immédiat des échantillons, car un éthanol trop titré risque de déformer les insectes et compliquer l'identification morphologique (l'eau qu'ils contiennent ayant tendance à sortir des insectes pour diluer le milieu extérieur).

On conseille l'utilisation de tubes à joint torique pour éviter l'évaporation du solvant (Sarstedt Ref. 72.694.007 (2 ml) et Ref 60.542.007 (8 ml)).

Si les volumes d'échantillons sont importants on pourra utiliser les contenants suivants : 30 ml (Fisher Scientific Ref 1064-9953)



Tubes Sarstedt pour le stockage des insectes

Le volume d'insectes ne devra pas dépasser le tiers du volume d'éthanol afin que celui-ci ne soit pas trop dilué par l'eau qui s'échappera des insectes.

Il est indispensable d'inclure dans les tubes une étiquette écrite au crayon graphite qui contient un minimum d'informations sur le prélèvement.

Le mieux est probablement de remplir un fichier afin de consigner toutes les informations de collecte (Excel par exemple), dans ce cas il faut et suffit de placer dans le tube une étiquette avec le code du tube écrit lisiblement (le code pourra également être reporté à l'extérieur du tube grâce à une étiquette autocollante).

Un code simple devra être attribué à chaque tube (à titre d'exemple le code pourrait être constitué de la manière suivante : initiale du prénom du collecteur + trois premières lettres de son nom + un chiffre de 1 à n. Ainsi JRAS0001 est le premier tube collecté par J.-y. RASplus)

Les informations à consigner dans chaque colonne du fichier compagnon sont :

- le code du tube
- le nom du collecteur
- la date de collection (intervalle si plusieurs jours d'exposition)
- le pays
- la région
- le département
- la localité
- la latitude (en degrés décimaux)
- la longitude (en degrés décimaux)
- l'altitude (en m)
- la plante hôte (si possible et pertinent)
- des notes si besoin

Une fois de retour au laboratoire et après une semaine environ, les échantillons seront transvasés dans de l'alcool à 96% afin de diminuer la concentration en eau qui risque d'hydrolyser l'ADN.

Le stockage pourra se faire à 4°C sur une courte période (2 semaines), sinon un stockage à -20°C sera préféré. On évitera au maximum les cycles de congélation et décongélation qui risquent d'endommager l'ADN.

Idéalement l'extraction d'ADN devra se faire rapidement après le retour du terrain

Pour la préservation de l'ADN les méthodes de collecte reposant sur la présence d'un mouillant sont déconseillées, à moins de ne relever les pièges tous les jours et de transvaser les insectes en éthanol 75°.

En ce qui concerne les pièges à glue, comme préciser plus haut, l'identification morphologique peut poser problème, mais **une fois une base de données de barcodes mise en place** (identification des espèces sur la base de leur ADN possible), **ces méthodes devraient pouvoir être utilisées afin d'effectuer un suivi épidémiologique.** En effet, il a été montré que si des insectes étaient laissés une dizaine de jours au soleil sur des pièges à glue et que les pièges à glue étaient conservés même plusieurs années à 4°C, ils pouvaient être utilisés pour la recherche de *Xylella spp.* (Bextine et al., 2005; Brady et al., 2012). **Cette approche devra toutefois être revalidée** (l'absence de précipitation semble un facteur clef, le stockage à si long terme n'étant pas nécessaire cette approche pourrait être pertinente)

**Annexe 7. Propositions d'exploitations possibles des données recueillies.
Premiers résultats sur l'analyse de la distribution géographique potentielle de
Xylella fastidiosa subsp. multiplex en France.**

1. Principes et données disponibles – limites de l'approche

Les données utilisées dans les analyses exploratoires présentées ici sont constituées d'un ensemble de 131 occurrences de *Xylella*, collectées dans 54 foyers, sur *Polygala myrtifolia* en Corse par les services en charge de la protection des végétaux (Fig. 1). Elles incluent 88 présences et 43 absences. Ces absences constatées, essentiellement en Haute Corse, représentent des échantillons de *Polygala myrtifolia* testés pour la présence de la bactérie, mais dont le test PCR a révélé un résultat négatif. **Il est important de signaler ici qu'un résultat négatif du test ne signifie pas une absence obligatoire de la bactérie, mais peut résulter d'une trop faible population bactérienne présente ou d'un problème lors de l'amplification (présence d'inhibiteur, problème non identifié).**

Les données ont été « declusterisées » avant analyse c'est-à-dire que les points très proches situés dans un même pixel ont été fusionnés. L'objectif est d'éviter ainsi de donner un poids démesuré à des occurrences collectées au même endroit et apportant donc la même information climatique. Le grain utilisé pour effectuer cette opération est celui des rasters les plus précis disponibles dans la base worldclim (Hijmans et al., 2005) soit une résolution de 30 secondes.

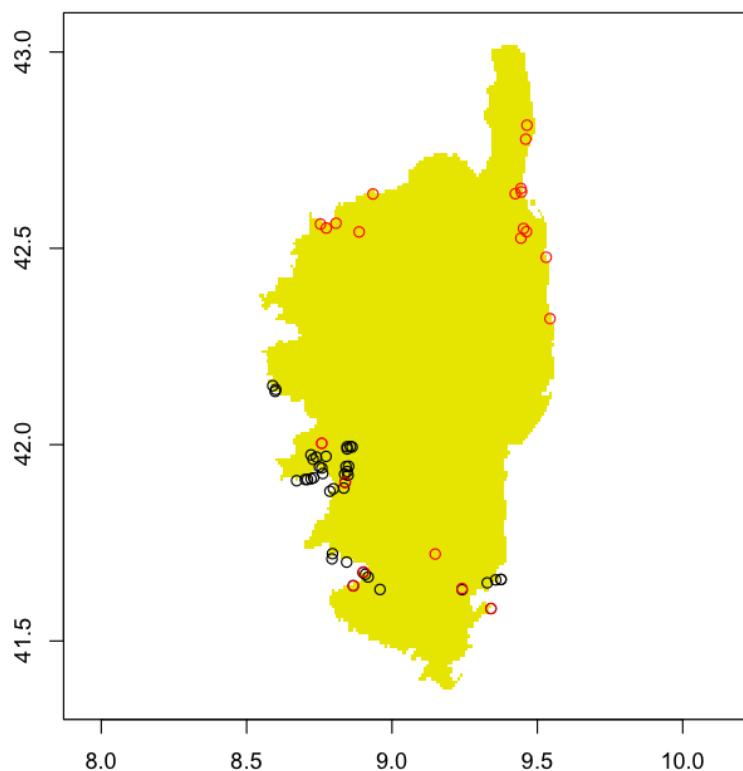


Figure 1 : Données d'occurrence de *Xylella* valides (présence = cercles noirs et absence = cercles rouges) disponibles au 28/08/15

Après cette opération, nous disposons de 42 présences et de 23 absences (Fig. 1). Ce nombre est faible et les points sont distribués sur une surface trop limitée pour réaliser

une analyse de distribution géographique potentielle dans de bonnes conditions. Tout signalement supplémentaire améliorera donc notablement la puissance statistique des analyses tout en modifiant peut-être considérablement les résultats eux-mêmes. Malgré ses limites identifiées, nous avons réalisé ce travail afin de montrer comment des approches de modélisation de ce type contribuent à 1) l'identification des facteurs climatiques pouvant influencer l'expansion de cette maladie thermosensible, 2) l'identification des zones où un échantillonnage supplémentaire serait utile, 3) apporter des éléments à l'estimation du risque que peut poser la maladie dans des territoires d'importance économique.

2. Méthodes

Nous avons réalisé une analyse de l'enveloppe climatique des localités où *Xylella* a été trouvée en Corse en nous basant sur les données climatiques disponibles dans la base de données worldclim (www.worldclim.org) (Hijmans et al., 2005). Les modèles d'aire de distribution sont communément utilisés dans ce but et l'abondante littérature dans ce domaine montre que les modèles sont sensibles au volume de données d'occurrence disponible ainsi qu'aux variables environnementales utilisées (Franklin, 2009). Nous avons exploré deux voies possibles pour sélectionner les variables climatiques à prendre en compte dans l'analyse (voir la liste des variables disponibles en fin d'annexe).

- 1) Analyse exploratoire préliminaire par ACP (Legendre and Legendre, 1998) du territoire Corse et cartographie des coordonnées des pixels sur les axes principaux. Les cartes informent sur la variation géographique de la synthèse multivariable du climat.
- 2) Utilisation de tous les descripteurs de la température disponibles (Variables Bio1 à Bio11 dans la base de données worldclim ainsi que les températures minimum de décembre à mars car la littérature indique que *Xylella* est limitée dans sa distribution par les minima des températures hivernales.

Sans surprise l'axe 1 de l'ACP (Figure 2, 3) traduit un gradient d'altitude qui n'a pas d'intérêt du point de vue de la distribution de *Xylella*. En revanche, l'axe 2 distingue les régions littorales du nord de l'île au reste de l'aire d'étude. Cet axe oppose des pixels caractérisés par des valeurs élevées des variables Bio7 et Bio2 (littoral nord) avec des pixels pour lesquels ces variables prennent des valeurs plus faibles (le reste de l'île).

Partant de cette information, nous avons retenu les variables BIO2 et BIO7 auxquelles nous avons ajouté la température minimum du mois de janvier, considérée dans la littérature comme l'une des contraintes climatiques majeures de *Xylella*.

Les données climatiques (Fig. 4) utilisées sont donc :

- Moyenne de l'écart de températures diurnes (BIO2 worldclim.org) (°c)
- L'amplitude annuelle de la température (BIO7 worldclim.org) (°c)
- La température minimum du mois de janvier (tm01 worldclim.org) (°c)

Le modèle retenu dans le cadre de cette analyse exploratoire est maxent (Elith et al., 2011).

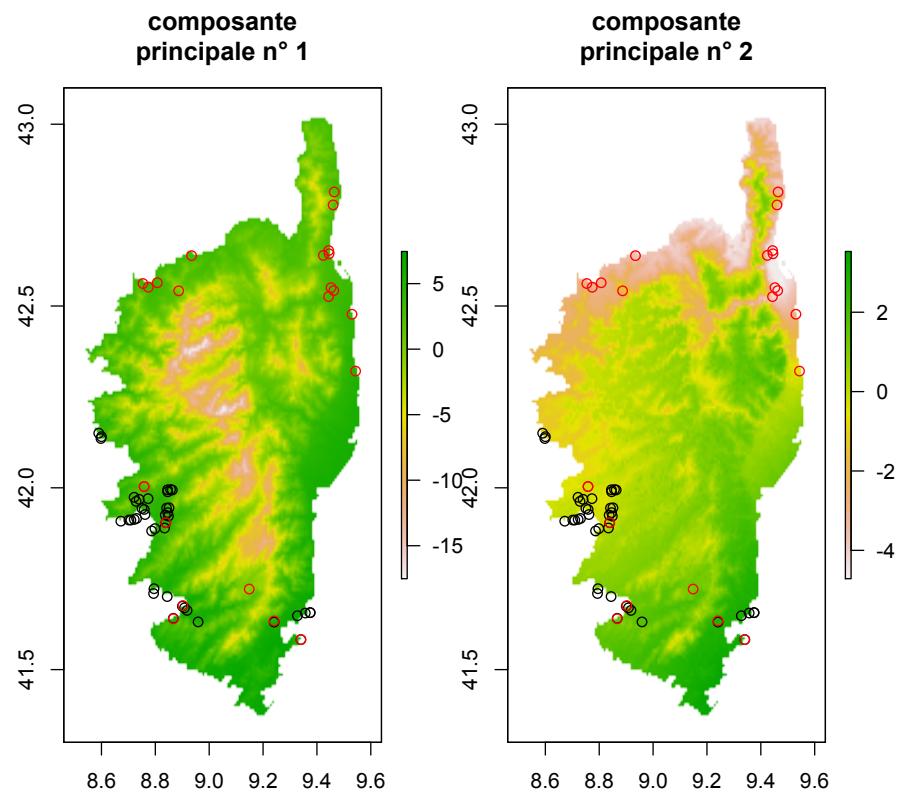


Figure 2 : Cartographie des coordonnées des pixels sur les axes 1 et 2 de l'ACP des données climatiques en Corse.

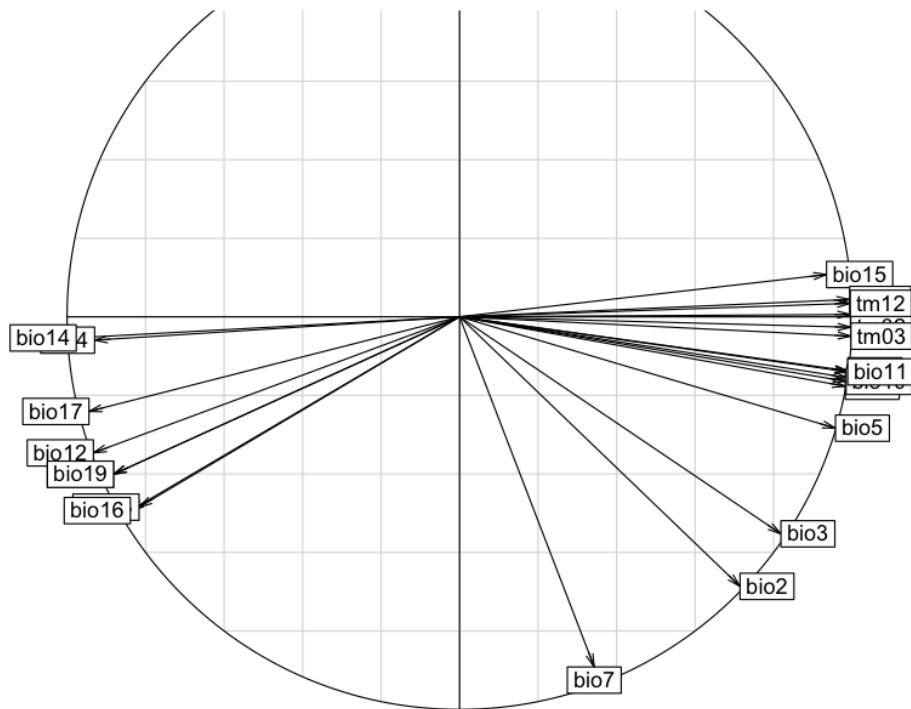


Figure 3 : Cercle des corrélations de l'ACP des données climatiques en Corse. Axe 1 : horizontal ; axe 2 : vertical.

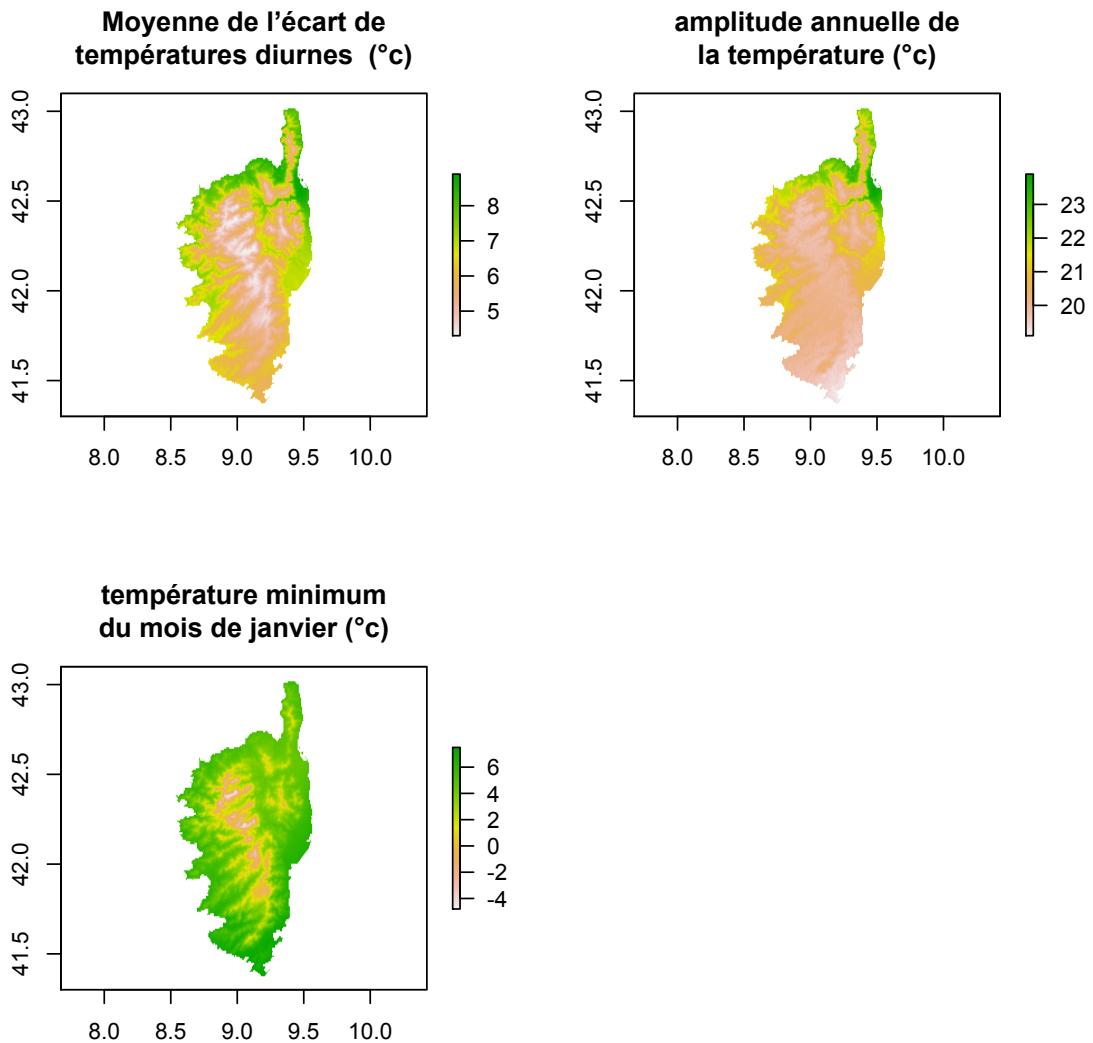


Figure 4 : Cartographie des variables climatiques utilisées dans la modélisation.

Il faut noter que les modèles d'aires de distribution tels que maxent doivent être utilisés avec prudence dans le cas d'invasion en cours car il est très difficile de distinguer les absences liées à des conditions environnementales défavorables des absences expliquées par le fait que l'organisme envahissant n'a pas encore colonisé l'ensemble des zones habitables (limite de dispersion).

3. Résultats

3.1 Modèle basé sur le sous-ensemble de variables climatique identifié par ACP

Le modèle maxent ajusté sur les occurrences corses avec les paramètres par défaut fonctionne de façon satisfaisante compte-tenu de la taille réduite du jeu de données. On obtient un AUC de 0.92. La figure 5 indique le niveau de risque (adéquation de l'habitat). ***On note la moindre exposition de la Haute-Corse exceptée la plaine orientale de l'île où un effort d'échantillonnage est nécessaire et pourrait apporter des informations précieuses pour améliorer notre approche.***

Le modèle a été utilisé pour estimer la similarité du climat français avec l'enveloppe climatique définie par les occurrences observées en Corse. **Les zones les plus climatiquement semblables aux localités infectées connues aujourd’hui en Corse se situent sur l’ensemble des côtes de l’île et dans le sud du pays, notamment dans la région d’Hyères. Le risque apparaît localisé et modéré.**

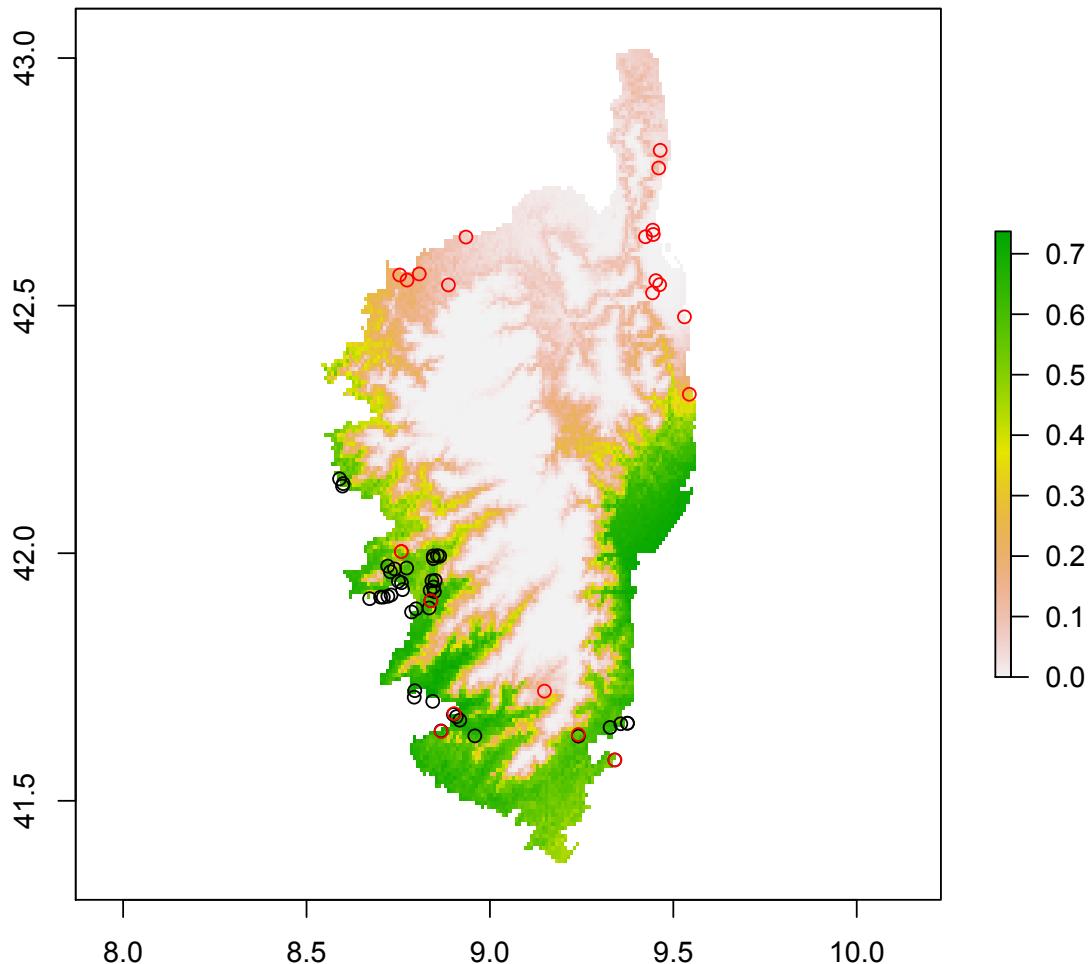


Figure 5 : Projection du modèle maxent sur la Corse. $0 < \text{adéquation de l'habitat} < 1$

L’ensemble des analyses convergent globalement vers le résultat suivant : le sud de la France est menacé par *Xylella*. Suivant les variables utilisées, le niveau de similarité entre les localités infectées en Corse et le sud de la France varie, renvoyant une image du risque différente. Ceci est inévitable avec un jeu de données réduit.

Il est cependant impossible d’évaluer la fiabilité de cette extrapolation des modèles ajustés en Corse sur l’ensemble du territoire français compte-tenu de la taille réduite du jeu de données initial.

De plus il est important de noter ici, qu'un événement de colonisation peut profondément changer les traits d'histoire de vie d'une population. Celle-ci va en effet s'adapter à son nouvel environnement et acquérir des propriétés biologiques différentes de celle de la population initiale. **Les projections que nous proposons ici, se font en quelque sorte à bio-écologie constante et ne peuvent pas tenir compte d'éventuelles adaptation ou transformation de traits de vie de la bactérie** lors par exemple d'une colonisation vers le continent. En conséquence, et c'est une faiblesse de ces projections actuelles, la réalité peut s'avérer très différentes de la prédiction. **Il est cependant possible d'améliorer ses projections et d'intégrer au moins pour partie les capacités d'adaptation, mais ceci nécessite un investissement recherche important qui n'est pas possible dans le cadre de ce rapport.** De plus, il est important pour parfaire l'analyse d'utiliser différents modèles pour réaliser ses projections, et d'explorer contentieusement les différents paramètres utilisés. Il est aussi important d'utiliser des approches croisant plusieurs modèles. Ceci n'a pas été réalisé et cette annexe doit être considérée comme une première approche exploratoire.

3.2 Modèle ajusté sur l'ensemble des descripteurs du climat

Les résultats obtenus avec le modèle « global » sont très similaires à ce que nous avons examiné au § précédent. L'AUC est de 0.98. Les prédictions sont quasi-identiques (Figure 6). D'une façon générale, il est cependant préférable de considérer les modèles les plus simples (principe de parcimonie) notamment parce que ce sont les modèles les plus performants pour réaliser des projections hors des zones dans lesquelles ils ont été ajustés (Franklin, 2009).

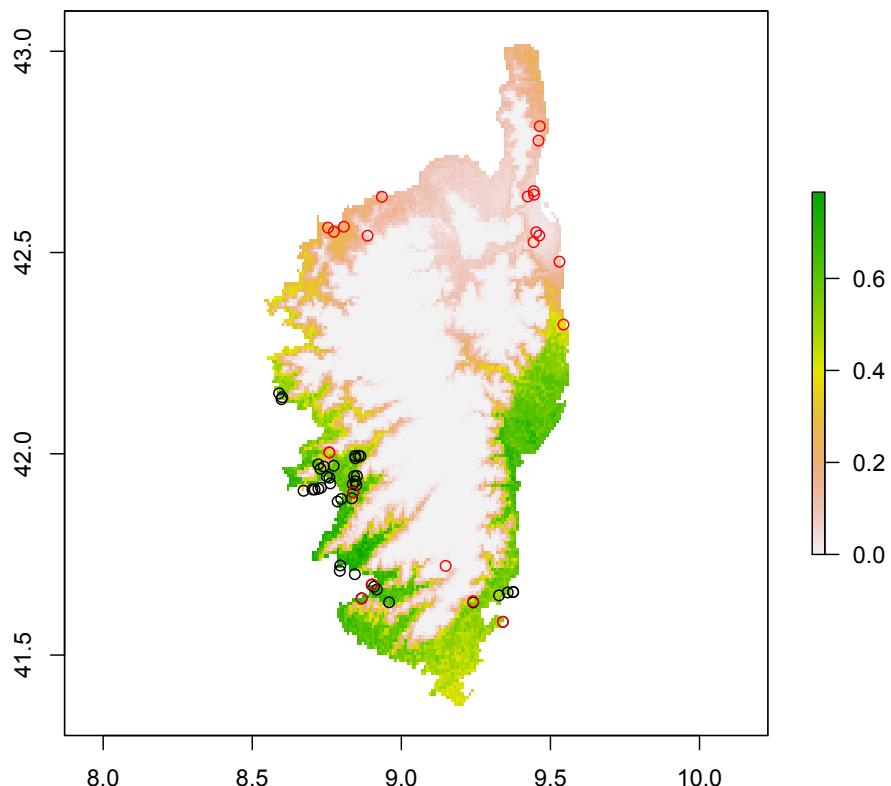


Figure 6 : Projection du modèle maxent basé sur l'ensemble des variables bioclimatiques disponibles. $0 < \text{adéquation de l'habitat} < 1$

4. Conclusions

Pour aller vers des analyses plus robustes avec un pouvoir prédictif amélioré il faut réunir un certain nombre de conditions et de données.

- Améliorer le nombre d'occurrences (mieux connaître l'ampleur de l'invasion en Corse)
- Disposer d'informations dans les pays voisins (Italie)
- Généraliser la géolocalisation des sites/végétaux testés et non infestés. Avec un focus sur les localités les plus éloignées géographiquement des foyers déjà identifiés, où l'infestation est ancienne et à proximité desquelles des tests négatifs ont été réalisés (connaître la position de ces plantes testées est également nécessaire).

De plus, les approches de modélisation simples basées uniquement sur des macro descripteurs du climat doivent être interprétées à la lumière d'analyses plus fines incorporant des informations sur l'écologie du système *Xylella* – vecteurs – hôtes. Seule cette approche combinée permettra de comprendre et anticiper l'expansion potentielle de *Xylella*.

Conclusions et recommandations

Nous ne sommes pas en mesure de fournir une analyse de risque fiable compte-tenu des données biologiques disponibles. La seule conclusion que nous pouvons faire est qu'il y a un risque important que *Xylella* puisse se maintenir en Corse et dans le sud de la France. Nous avons, en revanche, identifié un certain nombre de pistes sur lesquelles il faut maintenant travailler afin d'être en mesure de fournir des estimations plus fiables. Il apparaît évident qu'il faudra mobiliser des moyens substantiels pour faire un travail sérieux.

5. Liste des variables

Liste de variables « bioclimatiques utilisées dans cette analyse préliminaire en plus des températures minimum de décembre, janvier, février et mars (source : www.worldclim.org).

BIO1 = Annual Mean Temperature

BIO2 = Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))

BIO3 = Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)

BIO4 = Temperature Seasonality (standard deviation *100)

BIO5 = Max Temperature of Warmest Month

BIO6 = Min Temperature of Coldest Month

BIO7 = Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)

BIO8 = Mean Temperature of Wettest Quarter

BIO9 = Mean Temperature of Driest Quarter

BIO10 = Mean Temperature of Warmest Quarter

BIO11 = Mean Temperature of Coldest Quarter

Annexe 8. Résultats de l'échantillonnage d'insectes réalisé pendant la mission (vecteurs potentiels surlignés en jaune)

		Aphrophoridae		Cicadidae		Cicadellidae		Cixiidae		Dictyopharidae		Flatidae	Issidae	Membracidae
Date	Localité	<i>Aphrophora alni</i>	<i>Aphrophora pectoralis</i>	<i>Lepronia coleopterata</i>	<i>Neophilanthus</i> sp.	<i>Cicada ornata</i>	<i>Cicadella viridis</i>	Non vecteur potentiel	<i>Dicyaphara europaea</i>	<i>Metcalfa pruinosa</i>	<i>Mesaphora luteola</i>	<i>Ceresa bubalus</i>	<i>Gargara genistae</i>	
3.8.2015	Proriano, camping (extérieur du site)							1	2			1		
3.8.2015	Propriano, camping (intérieur du site)							4	1			15		
4.8.2015	Cauro (ou Grosseto-Prugna?)			1				12	2			4		
4.8.2015	Albitreccia, lotissement							2	1			2		
6.8.2015	Ajaccio près aéroport						50	16				7		
6.8.2015	Ajaccio près aéroport	2					9	1	1	13	15	1	2	
6.8.2015	Pierì, Casteulucciu							9				2	1	
6.8.2015	Porticcio							9				3		
7.8.2015	Ajaccio près aéroport		1			19	1			2	19			
7.8.2015	Ajaccio près aéroport					312	19	4					1	
7.8.2015	Porticcio (rocade)		39			328	189	10			8		3	
8.8.2015	Propriano près aéroport		1											
8.8.2015	Portiglio, plage aux vaches						25					10		
9.8.2015	Serra-di-Ferro, Favalella, Riv. Taravo	334						34			1	3	3	
9.8.2015	Portiglio, plage aux vaches		1					2			10			
9.8.2015	Olimeto, Scodi Neri				4									
10.8.2015	Alata, Truva							40	3		27	9		
10.8.2015	Près col Scalella							1				2		
10.8.2015	Près Tolla			1			40	44			1	4		
		2	335	42	1	4	758	390	24	15	115	31	8	
		TOTAL		1142								TOTAL		172

Annexe 9 : Recommandations sur les besoins en terme de recherche en vue du développement de nouveaux outils nécessaires à la lutte contre X. fastidiosa

Modélisation, épidémiologie, prédition

- Développement d'une liste et d'un site actualisé, donnant l'ensemble des plantes hôtes des sous-espèces de *Xylella*, les références des citations, les liens avec les données GenBank etc [env. 2 ans]
- Modélisation de la progression spatiotemporelle de *Xylella*. [env. 1 an]
- Ajustement à des données de suivi de l'épidémie (en particulier estimation statistique des capacités de dissémination). [env. 2 ans]
- Prédiction de l'expansion future des différentes souches. [env. 1 an]
- Estimation du risque à l'échelle française voire européenne. [env. 2 ans]
- Optimisation de plans de surveillance. [env. 1 an]
- Visualisation dynamique des données et des prédictions. [env. 5 ans]
- Construction d'une boîte à outils constituée de modèles et des méthodes statistiques associées pour prédire les dynamiques de bio-agresseurs en cas de crise sanitaire, avec un focus particulier sur *Xylella*. [env. 2 ans]
- Développement d'outils de type science participative pour le suivi de l'épidémie. [env. 2 ans]

Bactériologie

- Détermination des productions végétales d'intérêt pour l'agriculture française qui seraient potentiellement sensibles à *Xylella* en utilisant (i) de la génomique comparative et (ii) des expérimentations. [env. 3 ans]
- Travaux sur le pouvoir pathogène de la(les) souche(s) isolée(s) en Corse sur un panel de plantes potentiellement hôtes (plantes d'intérêt agronomique et patrimoniales). [env. 2 ans]
- Acquisition de connaissances sur la diversité de *Xylella* (prospections en zones où la bactérie est endémique). [env. 1 an]
- Détermination du rôle du microbiote vasculaire dans l'accueil de *Xylella*. [env. 5 ans]
- Identification des réponses de la plante à l'infection par *Xylella*. [env. 5 ans]
- Identification des mécanismes de tolérance à *Xylella*. [env. 5 ans]
- Compréhension de l'interaction bactérie / vecteur au niveau microscopique. [env. 2 ans]

Vecteurs

- Développer une base de données comprenant l'ensemble des informations taxonomiques (+ photos), géographiques (occurrences), biologiques (plante-hôtes, cycle de vie, préférendum climatique etc), écologiques (habitats, parasitoïdes et prédateurs) etc. des vecteurs potentiels de *Xylella* en Europe. [env. 2 ans]
- Etude sur la capacité de vécion des vecteurs potentiels intégration de cette information à la base de données afin de cartographier le risque dans les différents pays européens et pour les différentes sous-espèces de *Xylella*. [env. 5 ans]
- Développer une librairie de barcodes ADN multigéniques pour chacune des espèces de vecteurs présentes dans la base. Le but étant de fournir un outil permettant d'identifier

formellement et de manière validée l'ensemble des vecteurs potentiels en Europe et de lier détection génétique et métadonnées sur les entités impliquées. **[env. 2 ans]**

- Travaux de recherche sur les possibles complexes d'espèces [env. 2 ans]

- Développer des outils moléculaires à haut-débit permettant de détecter la présence de *Xylella* dans des insectes hôtes pour un suivi épidémiologique, voire dans les plantes. **[env. 1 an]**

Lutte

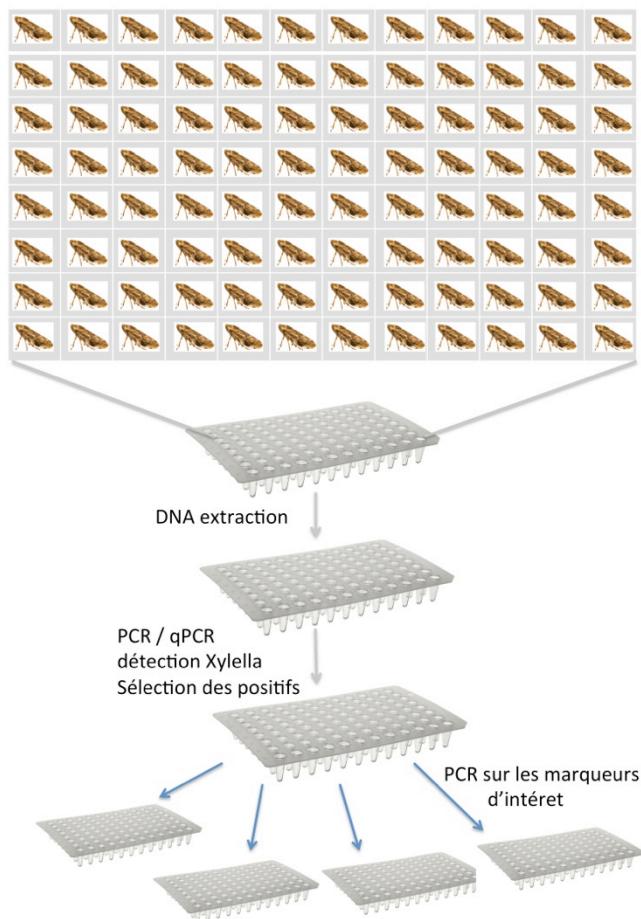
- Développement de moyens de lutte alternatifs aux pesticides contre les vecteurs (lutte biologique, etc.). **[env. 5 ans]**

- Evaluation de l'utilisation de phages (par exemple Xfas53) pour lutter contre *Xylella*. **[env. 3 ans]**

- Modification /adaptation du paysage des cultures (e.g. suppression de la strate herbacée etc...).**[env. 5 ans]**

- Elimination de plantes potentiellement hôtes de la maladie à proximité des cultures. **[env. 2 ans]**

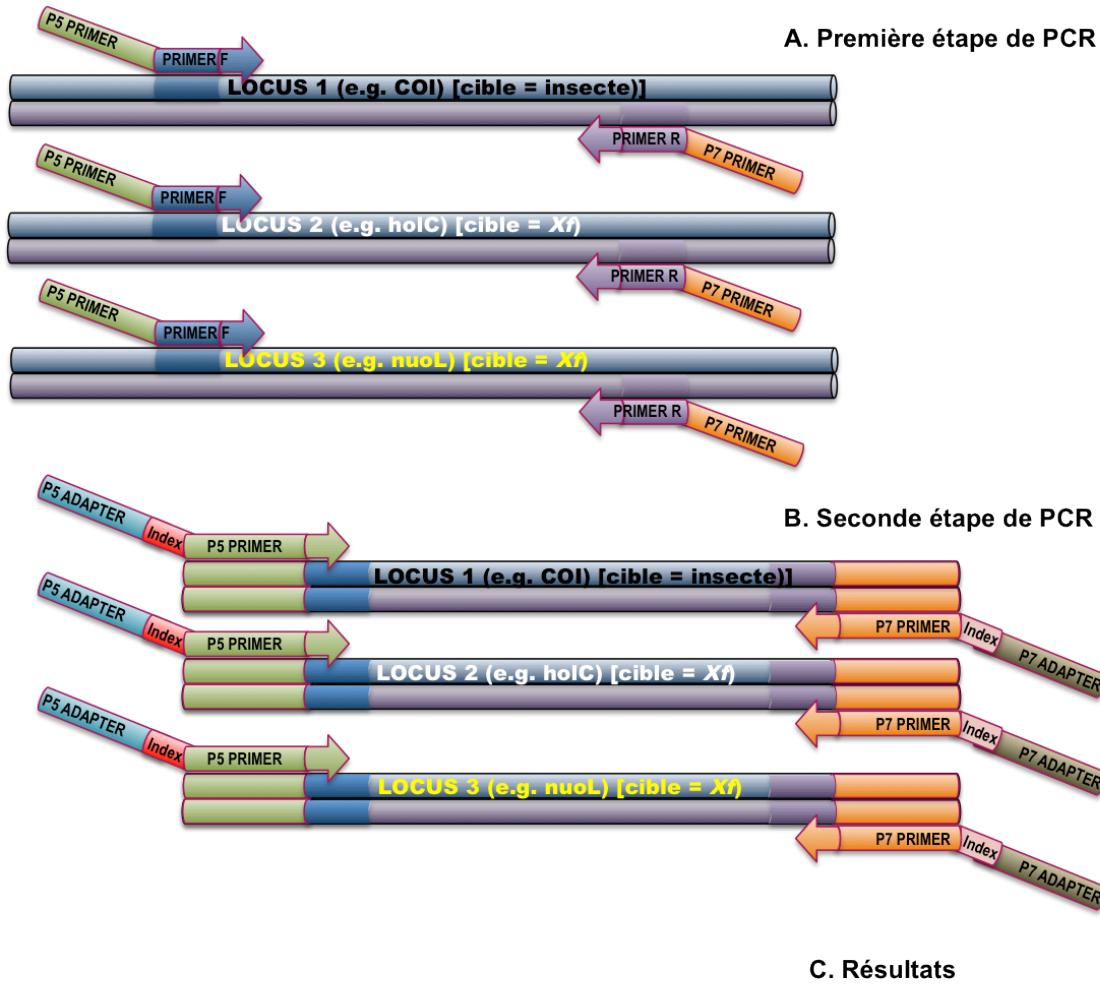
Annexe 10. Méthode à haut débit pour la détection et la caractérisation de *Xylella* spp. dans des insectes vecteurs.



L'ADN total est extrait puis la présence de *Xylella* est détectée par qPCR ou PCR sur un / des gènes d'intérêt. Une première caractérisation de la sous-espèces / souche peut être envisagée par qPCR avec sondes marquées.

Les échantillons positifs sont sélectionnés et amenés à l'étape d'amplification de tous les loci d'intérêt (2 loci pourraient être séquencés pour les insectes : le marqueur classique COI (Hebert et al., 2003) et un marqueur nucléaire en cas d'introgression mitochondriale (i.e. deux insectes d'espèces différentes partagent la même mitochondrie à cause d'une hybridation passée et d'une sélection d'un type mitotique avantageux) Les loci du typage MLST + gyrB, nuoN et pilU qui se sont révélés informatifs dans certaines études pourraient être amplifiés pour *Xylella*.

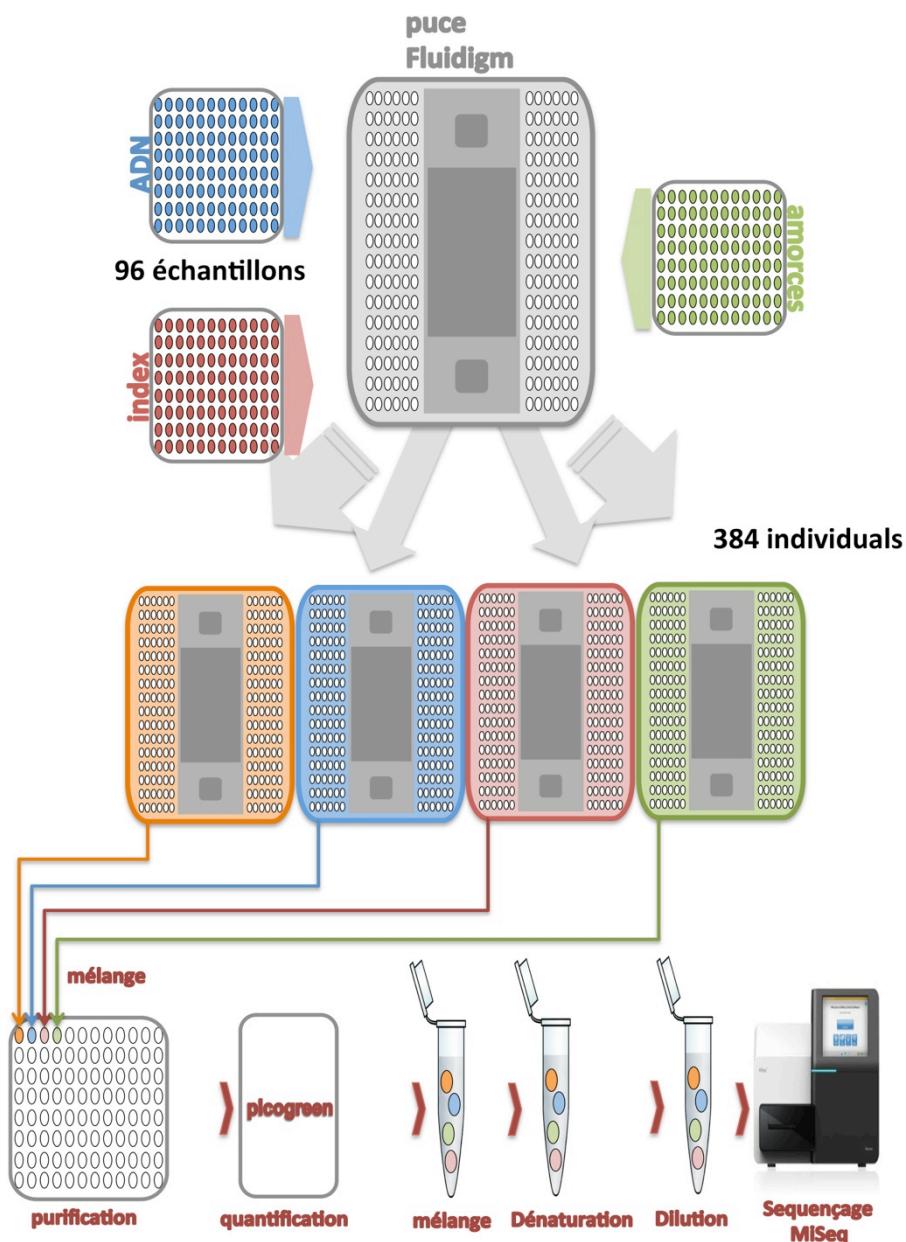
Note : il est possible d'amplifier le COI sur tous les insectes (y compris les négatifs pour avoir une idée des espèces et donc des taux d'infection si besoin)



Pour chaque échantillon positif chaque loci est amplifié indépendamment. Deux étapes de PCR sont nécessaires. Au cours de la première étape (A.) les loci d'intérêt sont amplifiés avec des amores spécifiques qui possèdent une petite queue qui sert d'amorce (P5 primer) pour la seconde étape de PCR (B.). Au cours de cette seconde étape de PCR les adaptateurs nécessaires à l'accrochage des amplicons sur les cellules du séquenceur sont ajoutés ainsi que des petits index (en rouge foncé et pâle sur l'image) qui vont permettre de différencier les échantillons entre eux.

Pour chaque échantillon on obtient donc plusieurs amplicons qui sont identifiés par des combinaisons d'index différentes entre elles.

Les amplicons sont envoyés à séquencer sur un séquenceur Illumina Miseq qui produit environ 20 millions de séquences. **Avec cette technique de marquage des individus on peut séquencer jusqu'à 1500 individus sur une douzaine de marqueurs.**



Avec la technologie Acces array Fluidigm il est possible d'automatiser les étapes de PCR pour que celles-ci soient réalisées dans des microvolumes et beaucoup plus rapidement

Annexe 11. Fiches de présentation des espèces de vecteurs potentiel présentes en Corse.

(Crédit photos G. Kunz, S. Puissant et JY. Rasplus)

***Ledra aurita* (Linnaeus) (12 à 18 mm)**

L. aurita présente une tête aplatie, son bord antérieur formant un angle obtus. Elle est identifiable par la présence de deux expansions foliacées sur le premier segment thoracique. Couleur foncière allant du gris au brun avec des points noirs et des protubérances rougeâtres distribuées à l'avant du corps. Elle se rencontre sur les chênes (*Quercus*) sur l'écorce desquels elle est mimétique avec les lichens, donnée également sur aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) et sur noisetiers (*Corylus* spp.). Les adultes sont présents de début mai à fin septembre. Cette espèce semble rare.



***Cicadella viridis* (Linnaeus) (5,7 à 9 mm)**

Cicadelle vert-bleuâtre avec, sur le sommet de la tête, deux taches noires à l'aspect multi-angulaire, les mâles ont les ailes plus sombres tirant sur un bleu-noir. Elle est présente dans des endroits ensoleillés à modérément ombragés, voire temporairement inondés, mais également des endroits secs comme des prairies sèches où l'on peut même trouver des larves. L'espèce est polyphage sur *Carex*, graminées, le plus souvent sur *Juncus* et *Phragmites*. La ponte peut avoir lieu sur un grand nombre d'arbres, *Fraxinus excelsior*, *Alnus glutinosa*, certains *Salix* sp. et *Populus* sp., également des arbres fruitiers, *Prunus persicae*, *Pyrus communis*, *P. malus*, *P. amygdalus*.



Les plus fortes populations se rencontrent dans les zones humides mais on peut également rencontrer cette espèce dans les forêts ouvertes, les clairières, les zones rudérales. Très commune, présente au moins jusqu'à 1200 m d'altitude.

***Aphrophora alni* (Fallen) (6 à 9 mm)**

Aphrophoridae à l'aspect fusiforme assez compact. Couleur de base gris-jaune, aile antérieure avec une légère pilosité, avec deux spots clairs dont un médian assez large et un postérieur plus petit. Présence d'une carène médiane du pronotum à la plaque frontale. Espèce au milieu trophique très varié, se trouve dans les différentes strates de plantes ligneuses, dans les milieux humides, généralement le long des étendues d'eau (lacs, étangs, rivières, ruisseaux) au niveau du couvert végétal.

Egalement dans les sites xérothermiques (secs et chauds) à strate arbustive éparses. Les adultes sont aisément récoltés par battage ou fauchage sur les arbres ou arbustes à feuilles caduques (*Salix*, *Alnus*, *Populus*, *Prunus*,



Cytisus, etc.). Les larves peuvent être trouvées au niveau de la strate herbacée sur un grand nombre de plantes (*Polygonum*, *Filipendula*, *Trifolium*, *Angelica*, *Galium*, *Ranunculus*, *Hieracium*, *Viola*, etc...), également sur les rejets de *Salix*, *Betula*, *Alnus*. Largement répandue, jusqu'à 1500 m.

***Aphrophora pectoralis* Matsumura (9,2 à 11,3 mm)**

Aspect plus allongé que l'espèce précédente, couleur foncière de gris-jaune à brun-jaune. Marge des ailes antérieures avec une tache jaunâtre délimitée par une bande noirâtre à l'arrière. A chercher le long des eaux courantes ou bien stagnantes, dans les zones de prairies humides, les forêts humides, les clairières, les haies. Les adultes et les larves sont fréquents sur différentes espèces de saules.



***Neophilaenus lineatus* (Linnaeus) (4,6 à 6,8 mm)**

Aphrophoridae au corps plus fin couleur paille avec une bande sombre sur le bord externe des ailes antérieures. Présence d'une carène sur la plaque frontale. Adaptable à une grande variété d'habitats, des peuplements de Poaceae ou de Cyperaceae, dans des zones ensoleillées à ombrageuses, milieux modérément secs à humides, dans les tourbières, prairies, pâtures, zones rudérales, forêts ouvertes, zones saumâtres et dunes côtières. Jusqu'à plus de 1600 m d'altitude. Parmi ses plantes-hôtes, des Poaceae (*Calamagrostis* spp., *Deschampsia* spp.,



©Gernot Kunz

Festuca spp., *Agrostis* spp., *Holcus* spp., *Ammophila arenaria*, etc.), des Cyperaceae (*Carex* spp., *Trichophorum cespitosum*, etc.).

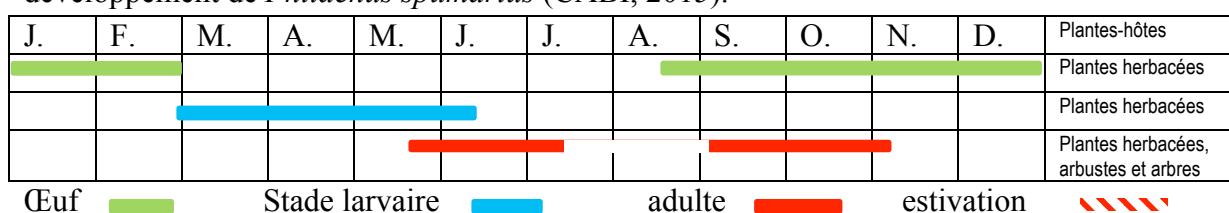
***Lepyrinia coleoptrata* (Linnaeus) (5,6 à 8 mm)**

Aphrophoridae de couleur gris jaune à brun jaune, forme du corps en un arrondi compacte. A chercher dans des endroits ensoleillés et secs, parfois aussi temporairement humides ou carrément humides, principalement en zones rudérales, bords de chemins, des dunes, des prairies sèches, prairies à faibles intrants; voire des terrains salés près de la côte. Adultes souvent sur des plantes herbacées. On peut trouver des larves en grand nombre sur de nombreuses plantes comme *Solidago*, *Artemisia*, *Carex*, *Phragmites*, *Vaccinium*, *Polygonum*, *Potentilla*, *Hypericum*.

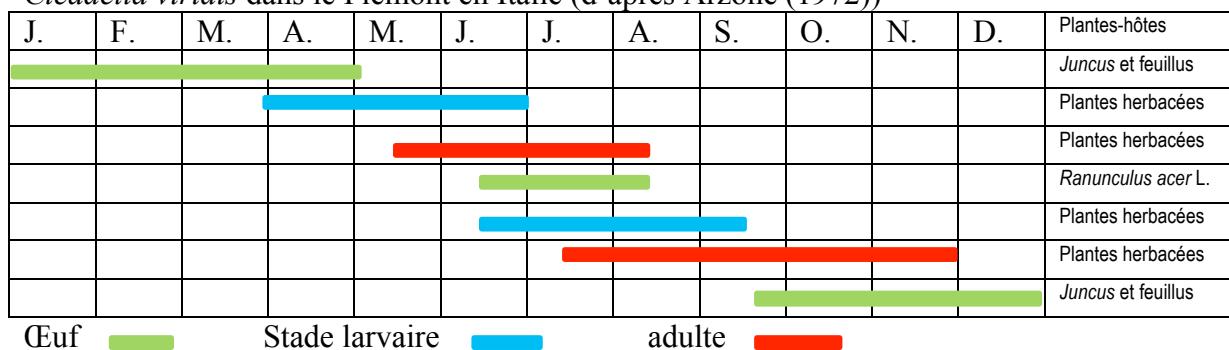


Ranunculus, *Plantago*, *Galium*, sur de nombreuses Ombellifères, également sur arbres et arbustes (*Salix*, *Populus*, *Betula*, *Corylus*). Très répandue, au moins jusqu'à 1250 m d'altitude en l'Europe continentale

Exemple de cycle biologique d'un espèce monovoltine : distribution des différents stades de développement de *Philaenus spumarius* (CABI, 2015).



Exemple d'une espèce multivoltine : distribution des différents stades de développement de *Cicadella viridis* dans le Piémont en Italie (d'après Arzone (1972))



***Philaenus spumarius* (Linnaeus) (5,3 à 6,9 mm)**

Forme du corps plus arrondie. Absence de carène sur le pronotum et la plaque frontale. La couleur est extrêmement variable du brun clair à presque noire, la forme typique est d'un brun jaune avec de lignes sombres assez indistinctes. Polyphage et adaptable à une grande variété d'habitats. Les adultes et les masses spumeuses (crachats de coucou) contenant les larves sont généralement présentes sur les dicotylédones herbacées (mais aussi sur les graminées, fougères, prêles, arbustes nains, et même sur les repousses des arbres et arbustes). Endroits secs, ensoleillés à modérément ombragés tels que les prairies (humides ou sèches), pâturages, forêts ouvertes, bordures des eaux courantes ou stagnantes, bords des chemins, zones rudérales, peuplement herbeux subalpins, etc. Souvent abondant dans les champs abandonnés à dicotylédones herbacées dominantes où les masses spumeuses peuvent être très importantes sur



Silene flos-cuculi, Cirsium arvense, Urtica dioica, Ranunculus repens, Filipendula ulmaria entre autres.

Le genre *Artemisia* serait son hôte préférentiel. On peut le trouver également mais en faible nombre sur des taxons végétaux largement évités par d'autres Auchenorrhyncha, par exemple sur Rubiaceae, Boraginaceae, Primulaceae, Brassicaceae et Orchidaceae. Plus de 1000 plantes hôtes répertoriées. Peut être présent jusqu'à 1800 m d'altitude

***Cicada orni* Linnaeus (environ 28 mm)**

Cigale bistre et verte, revêtue de pruine grisâtre, extrémité des nervures homélytrales tachetées. Les adultes sont présents de mi-juin à début septembre, voire mi-octobre, du niveau de la mer jusqu'à 1600m d'altitude. Ils se rencontrent dans les bois inondés de lumière où les femelles peuvent pondre sur les branches mortes et les mâles cymbaliser. On peut également trouver les femelles sur les tiges sèches de graminées présentes dans des pelouses proches des bois. Ces graminées servent également de support de ponte.



Récoltée entre Bonifacio et Porto-Vecchio, dans le nord-est (entre Canavagia et le Cap Corse) et entre Cargèse et Porto.

***Cicadetta fangoana* Boulard (17,5 mm)**

Cigale noire avec deux macules triangulaires ocrees sur le mésonotum, ocre roux dessous, ceintures abdominales rougeâtres. Cette espèce endémique de Corse est la plus abondante sur l'île. Les adultes sont présents dès début juin et jusqu'à la deuxième quinzaine de juillet du niveau de la mer à près de 1300m d'altitude. Présentes dans de nombreux biotopes, des pelouses aux bois en passant par tout type de landes. Populations nombreuses dans les strates de végétation s'échelonnant de 0,5 m à plus de 2 m de hauteur. Nombreuses localités de récolte dans le sud de l'île et entre Porto et le Cap Corse en passant par Corte.



***Tibicina Corsica* ssp. *Corsica* (Rambur) (23 mm)**

Cigale noire cotonneuse, 4 lunules ocrees sur le mésonotum, nervures jaunes sur la moitié basale des homélytres, bistres ensuite. Les adultes sont présents de début juin à début août, du niveau de la mer à 800m d'altitude. Des populations importantes peuvent être rencontrées sur des pelouses, par exemple avec une seule strate herbacée renfermant plusieurs espèces de plantes : asphodèle (*Asphodelus* sp.), ciste corse (*Cistus creticus corsicus*) ; ciste de Montpellier (*Cistus monspeliensis*), inule visqueuse (*Dittrichia viscosa*), sur immortelles des sables (*Helichrysum italicum microphyllum*). Egalement présent sur strates herbacées alternant avec des sols pierreux



avec des buissons espacés, des ronces (*Rubus* sp.), chardons, bruyère arborescente (*Erica arborea*), milieux résultant souvent d'une activité pastorale. *T. c. corsica* n'est jamais rencontrée en présence des autres espèces de cigales. Récoltée de la baie d'Ajaccio au Cap Corse.

***Tibicina nigronervosa* Fieber (22,5 mm)**

Cigale noire brillante, 4 lunules mesonotales jaune ocre, nervures entièrement noires. Espèce la plus rarement rencontrée sur l'île. Les adultes sont présents de début juin à la deuxième quinzaine de juillet, parfois en mélange avec *Cicadetta fangoana* du niveau de la mer à 400m d'altitude. Les landes hautes ouvertes ou fermées sont ses milieux de prédilection, avec des graminées, ciste corse, arbousier (*Arbustus unedo*), bruyère arborescente, avec des sols en partie nus. Parfois rencontrées en bois d'olivier (*Olea europaea*), chêne liège (*Quercus suber*), pins (*Pinus* sp.) s'ils sont pénétrés par la lumière. On peut y observer les adultes jusqu'à 3-4 m du sol.



Rencontrée dans quelques localités dans la région de Bonifacio et entre le Golfe de Porto et le Cap Corse et sur la côte est.

Annexe 12. Espèces de Polygala rencontrées en Corse

Photos communiquées par L. Hugot



Polygala myrtifolia



P. nicaeensis corsica



P. vulgaris vulgaris



P. monspeliaca



P. serpyllifolia



P. alpestris alpestris

Annexe 13 : Évaluation du laboratoire de l'Université de Corte sur son aptitude à répondre aux critères d'un laboratoire agréé pour la réalisation des analyses de détection de *X. fastidiosa* (visite du mercredi 05 août 2015)

Préambule : il a été noté que la demande concernant la réalisation d'analyses de détection de *Xylella fastidiosa* dans le laboratoire de l'Université de Corte, en tant que laboratoire agréé, n'a jamais été exprimée, ni souhaitée, ni par l'Université, ni par le centre INRA de Corte.

Présentation générale : L'évaluation du laboratoire a été réalisée le jeudi 05 août 2015 de 09h30 à 12h00 par Bruno Legendre, Jean-François Germain et Gilbert Chauvel, en présence de Mme Luciani (chercheuse à l'Université de Corte) et accompagné par M. Casabianca (président du centre de recherches de l'INRA de Corse) et par Mme Poirier (Chef de SRAL 2A).

Le site de l'Université est équipé de trois laboratoires : un laboratoire de virologie INSERM, un laboratoire de biochimie – Centre BIM – Institut de l'Environnement et un laboratoire de chimie des produits naturels UMR – CNRS 6134 SPE.

Le plan des locaux a été demandé mais n'est pas disponible à ce jour.

En termes de ressources humaines, chaque laboratoire est dirigé par un chercheur et assisté par du personnel stagiaire.

Eléments ressortant de la visite d'évaluation :

- Au regard des exigences requises en termes de confinement (directive européenne 2008/61) : **absence d'agrément préfectoral. Non respects des exigences.**
 - Absence de système de contrôle d'accès (locaux accueillant des étudiants).
 - Absence d'autoclave pour la destruction des déchets.
 - Absence de salle avec niveau de confinement NS3.
 - Absence de procédure décrivant l'organisation et la gestion des activités en conditions de confinement.
- Au regard de l'accréditation Cofrac pour la norme ISO 17025 : **absence de système de management de la qualité, pas de volonté d'engagement en ce sens**
- **Absence de locaux disponibles** pour l'activité analytique avec système organisationnel adapté (marche en avant, séparation des étapes lors du processus analytique).
- **Absence de personnel spécifiquement qualifié disponible**
- Expérience dans le domaine de la réalisation d'analyses de détection d'agents pathogène sur matrice végétale par PCR en temps réel : **extrêmement limitée. Ce**

domaine n'entrant pas dans le champ des activités de recherche menées par l'Université de Corte.

Conclusion : le laboratoire de l'Université de Corte ne répond pas aux critères exigés d'un laboratoire agréé pour la réalisation des analyses de détection de *Xylella fastidiosa*.