





# Xylella fastidiosa

## Avancement de la recherche

## Anses Laboratoire de la santé des végétaux









## Méthode officielle MA039 v3

## Méthode officielle développée, évaluée et validée en 2015 associant:

- Bonne sensibilité
- Automatisation
- Méthode robuste et facile à mettre en œuvre par les laboratoires agréés

Ayant permis de détecter *X. fastidiosa* sur plus de 40 plantes hôtes en Corse et en PACA

Cependant sur <u>olivier et chêne vert</u>, sensibilité plus faible observée lors de la validation et d'essais interlaboratoires

- → Depuis 2015: travaux visant à améliorer la sensibilité
- → Depuis 2017, mise en œuvre au LSV d'une double analyse en confirmation pour ces espèces:
  méthodo efficielle + extraction CTAP

méthode officielle + extraction CTAB

→ NB: Echantillons oliviers italiens détectés positifs avec la méthode officielle



## Amélioration de la méthode officielle

Amélioration de la méthode dans le cadre d'un travail collaboratif avec l'INRA d'Angers Emersys :

- Sonication (dislocation des biofilms)
- Extraction CTAB (protocole OEPP PM7/24)
- Modification des paramètres d'amplification Harper



- Validation en cours de la méthode optimisée
- Projet de publication de la version 4 de la MA039 en fin d'année, formation des laboratoires agréés, délégation







## Amélioration de la méthode officielle

En attente de la révision de la méthode et de sa délégation, en accord avec la SDQPV:

→ Depuis septembre 2018 Analyses de 1ère intention sur olivier et chêne vert réalisées au LSV, et non plus par les laboratoires agréés

#### **Double analyse:**

- Méthode officielle
- Méthode CTAB optimisée
- → A ce jour, pas de cas positif sur olivier



## Identification des souches de Xf

#### MultiLocus Sequence Typing (MLST) sur macérat végétal

#### → Evaluation / validation de la méthode

- Extraction d'ADN avec le kit QuickPick Plant DNA
- PCR conventionnelle Yuan et al., 2010 7 gènes de ménage ciblés
- Séquençage des amplifiats
- Analyse bio-informatique des résultats de séquençage par comparaison aux bases de données PubMLST
- Détermination du Sequence-Type (ST) et de la sous-espèce

#### 3 matrices évaluées:

Immortelle d'Italie, polygale, ciste de Montpellier









## Identification des souches de Xf par MLST

#### Evaluation / validation de la MLST sur macérat végétal

Inclusivité (15 souches Xylella): 100%

Exclusivité (40 souches): 100%

Spécificité: 100% (pour les 7 gènes de ménage)

Limite de détection de la PCR Yuan testée pour chacun des 7 gènes

Espèce végétale	Dilution extrait ADN	Limite de détection (probabilité de détection 100%)
Immortelle d'Italie	Extrait pur	Non détecté
	Dilué au 1/10ème	10⁵ bact / mL de macérat
Ciste de Montpellier	Extrait pur	104 bact / mL de macérat
	Dilué au 1/10ème	10⁵ bact / mL de macérat
Polygala myrtifolia	Extrait pur	10⁴ bact / mL de macérat
	Dilué au 1/10ème	10⁵ bac / mL de macérat

<u>Conclusion</u>: la sensibilité de la PCR et donc sa limite de détection est variable selon les espèces végétales La dilution peut apporter un gain de sensibilité, <u>amélioration en cours</u>



# Méthode développée / validée par l'Anses sur *Philaenus spumarius*

#### Un insecte (1 tête)





- Broyage dans 200 µl d'eau deminéralisée stérile
- 10 billes métalliques (3 mm)
- Agitation à haute fréquence (RETSCH MM400 durant 2 min à
- 30 Hertz)





Extraction d'ADN automatisée Kit QuickPick™ Plant DNA (Bio-Nobile) Automate KingFisher™

# Amplification par PCR en temps réel duplex



- Harper et al., 2010
- loos et al., 2009 (contrôle interne)

#### Critères de performance

Sensibilité	100%
Specificité	100%
Repetabilité	100%
Limite de détection (détection à 100%)	> 10 <sup>3</sup> bact/tête



Essai interlaboratoire de validation (EILV) organisé par l'Anses - Projet Euphresco en 2017-2018

20 laboratoires européens participants

#### Insectes artificiellement contaminés

- ➤ 4 PCR: Harper et al., 2010; duplex Harper-loos; Francis et al., 2006; LAMP Harper et al., 2010 modifiée Yaseen et al., 2015

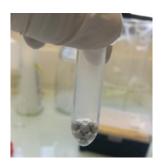
#### **Conclusion:**

Performances similaires entre les 2 méthodes d'extraction et entre les différentes PCR sauf pour PCR Francis et al., 2006 dont la sensibilité apparait moindre



# Comparaison de 2 méthodes d'extraction de l'ADN sur *Philaenus spumarius*

- Protocole interne LSV Protocol broyage Kit QuickPick Plant DNA
- Protocole Cruaud et al., 2018
  Kit tubes de broyage
  Protocole d'extraction développé
  par INRA CBGP Montpellier intégrant
  divers réactifs pour la levée d'inhibition
  Utilisation de billes magnétiques







Amplification: PCR en temps réel multiplex Harper et al., 2010 / loos et al., 2009

Nested PCR Cruaud et al. 2018 non évaluée



# Comparaison de 2 méthodes d'extraction de l'ADN sur *Philaenus spumarius*

#### Résultats / Conclusion

Critères	Anses	Cruaud <i>et al</i> ., 2018
Sensibilité	81 %	52 %
Specificité	100 %	100 %
Répétabilité	91 %	84 %
Détection à 100 bact/tête	74 %	17 %
Détection à 1000 bact/tête	100 %	78 %



Les test décrits dans Cruaud *et al.*, 2018 (broyage et extraction d'ADN) n'ont pas permis d'améliorer les performances de la méthode retenue par l'Anses

### Evaluation analyse d'échantillons composites

### → Analyse sur groupe d'insectes





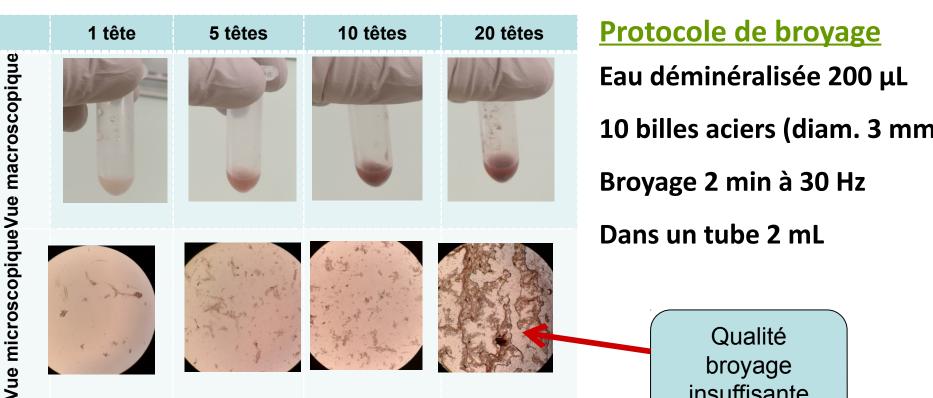
Philaenus spumarius

Evaluation 5, 10, 15, 20 insectes

Broyage / Extraction ADN / Amplification PCR



## Tests de broyage sur échantillons composites (Philaenus spumarius)



broyage insuffisante



#### Evaluation analyse sur échantillons composites

#### Résultats / conclusion :

- La limite de détection de la PCR en temps réel Harper et al., 2010 n'est pas affectée par le nombre de têtes (jusqu'à 15 têtes)
- ➢ Identification de la sous-espèce par MLST (PCR Yuan et al. 2010 ) sur groupe d'insectes en cours d'évaluation

#### Philaenus spumarius vs autres insectes

Essai sur *Neophileanus lineatus* (vecteur potentiel) avec le protocole interne LSV validé sur *P. spumarius* 



Résultats: moindre sensibilité (présence d'inhibiteurs?) Travaux d'optimisation à poursuivre...

#### Analyses sur insectes collectés en Corse et en PACA

PACA (collecte 2017 sur foyers)

21 *P. spumarius* analysés 9,5% de positifs Souche *multiplex* ST7

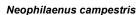
3 Cicadella viridis 1 Neophilaenus campestris

→ Négatifs

Corse (collecte 2016 sur foyers)

1042 *P. spumarius* analysés env. 9% de positifs
Souches *multiplex* ST6/ST7







Cicadella viridis

NB: Vecteurs compétents identifiés en Italie:

Philaenus spumarius, Neophilaenus campestris, Philaenus italosignus



## Thèse Enora Dupas (Anses / EmerSys)

#### PCR multiplex détection / identification

➤ Mise au point de sets d'amorces et de sondes permettant la détection et l'identification de la sous-espèce en une analyse unique

#### PCR digitale (ddPCR)

- PCR permettant la duplication de l'échantillon analysé en 15 000 à 20 000 sous-échantillons (micro gouttelettes) permettant en théorie de s'affranchir des composés inhibiteurs et de quantifier le nombre de cibles
- → Pas de réel apport par rapport à la PCR en temps réel
- → Intérêt pour la quantification bactérienne pour activités de méthodologie ou détermination de niveau de contamination

#### **Analyses MLVA**

Identifier les routes d'invasion et le nombre d'introductions à partir des isolats collectés



## Travaux autres instituts et pays tiers UE

#### Projets européens Ponte et XF-Actors





- Sélection de cultivars d'olivier tolérants
- Identification de gènes de résistance sur olivier
- Vecteurs essais de transmission
- Vecteurs: études et enquêtes faunistiques
- Vecteurs: « confusions sexuelle » (signaux vibrationnels)
- Test du pouvoir pathogène (détermination des plantes hôtes)
- Evaluation d'espèces prédatrices des vecteurs







Araniellla cucurbitina



## Travaux autres instituts et pays tiers UE

#### Projets européens Ponte et XF-Actors

- Microorganismes antagonistes (ex: Paraburkholderia phytofirmans PsJN)
- Imagerie hyperspectrale: détection précoce sur oliveraie par image aérienne
- Phagothérapie (virus bactériophages)
- Protocole consensuel européen OEPP PM7/24 version 3 publiée en juillet 2018, en cours de révision

**Support financier** 

SUSTAINABLE FOOD SECURITY

H2020-SFS-2014-2 Sub call of: H2020-SFS-2014-2015

SFS-03a-2014: Native and alien pests in agriculture and forestry POnTE

(Pest Organisms Threatening Europe) cod. 635646

web: www.ponteproject.eu | mail: info@ponteproject.eu





## Merci pour votre attention

