





Mini-synthèse des travaux du GT Surveillance de Xylella fastidiosa (GT SXF) de la Plateforme ESV

INTRODUCTION

► Historique du GT

Le groupe de travail « Surveillance de *Xylella fastidiosa* » (GT SXF) a été lancé à l'initiative de la Direction générale de l'Alimentation (DGAI), gestionnaire du risque, afin de lui apporter un appui et d'améliorer la surveillance de la bactérie *Xylella fastidiosa*. Ce GT a été mis en place dès le début 2016, quelques mois après la détection de *X. fastidiosa* en France (en Corse et en PACA durant l'été 2015) et en préfiguration de la Plateforme d'EpidémioSurveillance Végétale (PESV).

Actuellement, il n'existe pas de moyens curatifs pour lutter contre cette bactérie. La réglementation européenne impose l'arrachage et la destruction des plantes contaminés ainsi que la conduite d'une surveillance annuelle renforcée des zones alentours. *X. fastidiosa* en tant qu'organisme de quarantaine prioritaire, a un impact potentiel pour les filières agricoles végétales considéré comme le plus grave pour le territoire de l'Union Européenne par son incidence économique, environnementale ou sociale. La lutte en vue de son éradication ou, à défaut, de son enrayement, est obligatoire sur tout le territoire européen. Il est donc essentiel de limiter son introduction et sa dissémination sur le territoire.

► Mandat du GT

- 1. Aujourd'hui en France, l'objectif de la surveillance de *X. fastidiosa* est d'abord la détection précoce d'éventuelles introductions de souches d'autres sous-espèces que *X. fastidiosa subsp. multiplex* déjà présente sur le territoire, en particulier des sousespèces *fastidiosa* ou *pauca*. Le GT SXF cherche donc à améliorer la précocité de détection, à travers tout moyen pouvant y concourir. En particulier, les travaux portent sur :
- L'évaluation de l'adéquation de la distribution de la pression de surveillance officielle sur le territoire vis-à-vis du risque, eu égard aux connaissances scientifiques disponibles et aux données déjà collectées par les différents dispositifs.
- L'évaluation de l'emploi de la surveillance vectorielle sur la base des résultats obtenus lors de la surveillance vectorielle en zone délimitée en Corse, PACA et Occitanie et des données de recherche (LSV, INRAE) disponibles.

- L'évaluation des possibilités d'amélioration de la surveillance aux points d'entrée communautaires, basée sur l'analyse du risque d'introduction et prenant en compte l'ensemble des méthodes d'analyse disponibles.
- Le renforcement de la surveillance événementielle via des actions de sensibilisation et des formations. L'objectif est de permettre, auprès du public concerné, une descente optimale de l'information technique sur X.fastidiosa, ses hôtes et leurs symptômes, en vue et d'une remontée plus systématique et plus rapide de toute observation de symptômes douteux.
- 2. Le deuxième objectif de la surveillance actuelle est la délimitation des zones tampons autour des foyers, où l'essentiel des nouveaux foyers sont détectés. Le GT SXF pourra poursuivre son appui dans la définition de dispositifs de délimitation sur la base des travaux menés dans le cadre de la mission en Occitanie.
- Faire le point sur l'utilisation des données de surveillance, la pertinence des outils et des fréquences de mises à jour au vu du contexte.
- Enfin, le GT SXF contribue à identifier les besoins de recherche intéressant la surveillance.

THÉMATIQUES

► Appui à la Rédaction d'instructions techniques

Le GT SXF a été fortement impliqué dès sa création dans la rédaction des parties relatives à la surveillance dans des instructions techniques de la DGAL, gestionnaire du dispositif de surveillance. Des mises à jour ont été nécessaires pour prendre en compte les évolutions réglementaires au niveau européen.

Le Plan de surveillance pluriannuel national de X. fastidiosa décrit les différents dispositifs mis en œuvre et leur articulation afin de vérifier le caractère exempt du territoire national et de détecter, le cas échéant, la présence de l'organisme nuisible le plus précocement possible. La surveillance du territoire permet également d'assurer la qualité des végétaux et produits végétaux exportés. La surveillance programmée (SORE, PP, réseau du département de la santé des forêts, surveillance biologique du territoire) et la surveillance évènementielle (signalements spontanés) sont complémentaires pour atteindre ces objectifs. Le GT SXF a participé à la rédaction des versions successives de cette instruction technique (IT DGAL/SDQPV/2016-413 du 18/05/2016, IT DGAL/2017-653 du 01/08/2017, une dernière version est en cours de finalisation).

Conformément à l'article 25 du règlement (UE) n°2016/2031 et à l'article 3 du règlement d'exécution (UE) 2020/1201, le plan national d'intervention sanitaire



d'urgence (PNISU, instruction technique DGAL/SAS/2021-469 du 17/06/2021) définit les mesures devant être prises sur le territoire national en ce qui concerne l'éradication de X. fastidiosa, la mise en circulation des végétaux spécifiés à l'intérieur et hors de zone délimitée et les contrôles officiels associés. Le GT SXF a été sollicité notamment sur les parties relatives à la surveillance à mettre en œuvre dans les zones délimitées autour des foyers.

Enfin, le plan de surveillance vectorielle de X. fastidiosa en zone délimitée a été décrit dans l'instruction technique DGAL/SDSPV/2021-453 du 11/06/2021.

▶ Evaluation OASIS

L'évaluation du dispositif de surveillance de X. fastidiosa a été réalisée entre 2020 et 2021 dans un contexte de renforcement de la surveillance nationale de la bactérie sur le territoire et de la révision de la réglementation européenne en matière de lutte (règlement d'exécution 2020/1201 de la commission européenne). Cette demande a été diligentée par la DGAL auprès de la PESV. L'évaluation a été réalisée par une équipe d'évaluation (Anses et DGAL) grâce à la méthode OASIS sur la base d'une série d'entretiens avec un panel d'acteurs impliqués dans la surveillance de X. fastidiosa à l'échelle nationale et régionale. Au total, 44 personnes ont été interviewées intervenant à différents niveaux de la surveillance i.e surveillance programmée officielle, gestion de foyers, professionnels et experts. La surveillance programmée non officielle et la surveillance évènementielle ont été également considérées dans le système de surveillance de X. fastidiosa comme des dispositifs contributeurs importants. Cette évaluation a permis d'émettre un certain nombre recommandations pour améliorer la surveillance sur la base d'une analyse approfondie du maillage territorial et du fonctionnement mis en place pour assurer une détection précoce de la maladie dans les zones indemnes et d'un suivi de la maladie dans les zones contaminées. En complément de ce travail, des évaluations supplémentaires pourraient être déployées pour affiner l'analyse de certains aspects de la surveillance comme par exemple une évaluation économique ou une évaluation de la sensibilité du système de surveillance.

► Mission Occitanie

X. fastidiosa a été détectée en septembre 2020 dans le département de l'Aude en région Occitanie, région jusqu'alors indemne. Le renforcement de la surveillance a conduit à une extension de la zone délimitée. Afin d'évaluer l'étendue de cette contamination dans le département de l'Aude et plus largement au niveau de la région Occitanie, la DGAI a sollicité le GT SXF de la PESV pour apporter un appui méthodologique à la DRAAF (SRAL) Occitanie. Cette mission conduite au second semestre 2021 a eu pour objectif de déployer une méthodologie de prospection de délimitation dans la région Occitanie sur la base des connaissances de la situation sanitaire, des connaissances scientifiques de la maladie et des facteurs de risque qui y sont associés. Le format inédit de cette mission portée par la PESV a permis de coconstruire des recommandations pour l'amélioration du dispositif de surveillance. Lors de la phase terrain, les apports des participants dans leurs domaines de



compétence (épidémiologistes, biologistes, entomologistes, biostatisticien. gestionnaires, inspecteurs, filières ...), la structuration des tournées sur le terrain en groupes complémentaires et les réunions de restitution en soirée, ainsi qu'un échange avec des professionnels de filières végétales spécialisées (amandier, olivier, horticulture ornementale) ont permis de partager les points de vue en temps réel. Ce format pourrait être utilement renouvelé en appui au gestionnaire de dispositif en cas d'émergence ou de nécessaire redéfinition d'une stratégie de surveillance sur un organisme de quarantaine.

► Gestion des données et outils de visualisation

Dans le cadre de la surveillance de X. fastidiosa, la PESV centralise les données issues de plusieurs sources :

- données de terrain (prélèvements de végétaux) récoltées par les SRAL/DRAAF ou leurs délégataires
- données de laboratoire : résultats des analyses transmis par les laboratoires agréés et le Laboratoire National de Référence.

Un script automatisé permet de vérifier plusieurs critères afin de garantir la qualité des données:

- l'absence de doublons
- le respect du format des numéros de prélèvements
- la validité des dates
- la liste des espèces végétales présentes dans la nomenclature botanique ... L'ensemble de ces critères est contenu dans un rapport généré automatiquement par le script. Si nécessaire des corrections sont ensuite effectuées (ex : homogénéisation des modalités ...).

L'expertise développée pour ce travail a aussi permis à la PESV de collaborer, aux côtés des autres plateformes d'Épidémiosurveillance en Santé Animale (ESA) et de Surveillance de la Chaîne Alimentaire (SCA), à la mise en place d'un guide sur la qualité des données de surveillance (https://wiki.esa.inrae.fr/books/guide-pratiquesurla-qualite-des-donnees-de-surveillance).

Des applications R shiny, mises à jour de façon hebdomadaire, permettent de valoriser et visualiser ces données :

- une application privée: mise à disposition de jeux de données, cartes interactives, indicateurs de la qualité des données
- application publique délimitées une carte des zones (https://shinypublic.anses.fr/Xylella fastidiosa/)

Ces données sont également anonymisées et mises à disposition à des fins de recherche (doi du dataset : https://doi.org/10.15454/RWBIWD).

Les données générées par ce dispositif de surveillance sont aussi analysées et valorisées via des rapports (Identification des périodes optimales de surveillance de X. fastidiosa et expression des symptômes), des présentations lors de congrès (cartes



de risques), sur le site internet de la plateforme... Ces travaux s'inscrivent dans une perspective d'optimisation et d'amélioration des plans de surveillance de la bactérie sur le territoire national.

► Appui à l'analyse du risque pour la surveillance

Les cartes de risques peuvent être construites à partir de différentes méthodes d'analyse statistique. Dans le cadre du GT SXF, deux cartes de risques se basant principalement sur des données bioclimatiques et d'usage des sols ont été réalisées. Les méthodes utilisées s'apparentent à un calcul d'indice de similarité entre une zone infectée par la bactérie et une zone exempte (représenté par des mailles de 2x2km). La première carte, réalisée en 2019, sur la France métropolitaine, a été construite via l'algorithme MESS (Multivariate Environmental Similarity Surfaces, Elith et al 2010) et compare la France métropolitaine exempte de la bactérie au foyer de X. fastidiosa en Provence-Alpes-Côte d'Azur. La deuxième carte, réalisé en 2021 dans le cadre de la mission Occitanie, se base sur le calcul d'un indice de distance entre les foyers infectés dans l'Aude et le reste de la région occitane. Ces deux cartes ont mis en avant des zones plus ou moins à risque du point de vue de l'établissement de la bactérie (le pourtour méditerranéen et le département audois). Les cartes basées sur le risque comme celles des cartes climatiques peuvent être intégrées à l'analyse de risque afin d'améliorer le dispositif de surveillance. Ces cartes permettent de repérer les zones les plus à risque. En juxtaposant sur ces cartes l'effort d'échantillonnage, il sera possible de repérer des zones où la surveillance n'est pas suffisante vis à vis du risque et à contrario les zones où il y a beaucoup d'observations. La stratégie d'échantillonnage pourra alors être améliorer en utilisant un modèle mathématique approprié ou l'utilisation de l'outil RIBESS+ pour déterminer et répartir le nombre de prélèvement à réaliser en fonction du risque. Cela permettra d'analyser si la surveillance actuelle est appropriée et l'améliorer ou bien la refondre complètement si nécessaire. Dans le cadre de la mission Occitanie, la carte d'établissement a permis de mettre en place un plan de surveillance autour de la zone la plus à risque et d'identifier les quadrats à inspecter.

▶ Identification des périodes optimales de surveillance de XF et étude de l'expression des symptômes en PACA et Corse

La surveillance de X. fastidiosa réalisée depuis 2015 sur le territoire national nécessite des adaptations et des optimisations constantes afin de détecter le plus précocement possible la bactérie. A cette fin, la DGAL a sollicité la PESV pour mener une étude sur les périodes optimales de surveillance de la bactérie et l'expression des symptômes en régions PACA et Corse. Ce travail a nécessité au préalable un regroupement des données de surveillance selon les modalités de surveillance. Sur cette base, une analyse descriptive des données collectées entre 2015 et 2019 a été réalisée pour les deux régions. L'identification des périodes optimales de surveillance a été étudiée par la proportion de plantes infectées à X. fastidiosa (associée à des intervalles de



confiance) toutes années confondues, par modalité de surveillance pour les espèces les plus représentées parmi les espèces hôtes déjà contaminées. Le degré de dépendance entre l'expression des symptômes et l'infection des plantes a été étudié à l'aide de l'odds ratio selon la modalité de surveillance et l'espèce végétale considérée. Ces études ont tout d'abord été réalisées pour chaque région séparément puis sur les deux régions réunies. Ce travail a permis d'identifier des tendances et d'émettre des recommandations d'échantillonnage pour les périodes les plus à risque. En outre, il a été démontré un risque d'infection plus élevé chez les plantes symptomatiques que les plantes asymptomatiques notamment pour certaines espèces végétales. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour l'orientation de la surveillance en se basant sur le risque.

► Caractérisation du territoire PACA et Occitanie pour la mise en place de **RIBESS**

Dans le cadre de la surveillance des zones tampons en Provence-Alpes-Côte d'Azur et en Occitanie pour les années 2021 et 2022, une méthodologie permettant de caractériser le territoire a été développée afin de pouvoir utiliser et prendre en compte les recommandations fournies par l'outil RIBESS. Cet outil, développé par l'EFSA, permet de calibrer la taille de l'échantillon requis pour la surveillance d'une zone. Les zones tampons sont constituées par des unités épidémiologiques (mailles de 100 m par 100 m) qu'il convient de caractériser selon l'occupation du sol afin de définir une catégorie d'appartenance à un milieu naturel, la population cible étant les plantes hôtes.

La méthode de caractérisation se base, lorsque la zone d'étude est relativement petite, sur des inventaires précis réalisés directement sur le terrain. Lorsque l'inventaire n'est pas envisageable (zone d'étude trop étendue), la caractérisation se base sur des couches spatiales disponibles en open-data. Nous pouvons citer la couche d'occupation du sol OSO¹ (couche spatiale se basant sur des images satellitaires Sentinel-2), le Registre Parcellaire Graphique (RPG) 2 et la Base de Données Topographiques (BD TOPO®)³. Pour chaque maille, on extrait les informations de la couche spatiale, la catégorie la plus représentée en terme surfacique est attribuée au quadrat.

La caractérisation permet de définir, de manière plus ou moins exhaustive, les zones tampons en plusieurs grandes catégories d'usage des sols (ex : urbain, forêt, vigne, verger, semi-naturel, etc.). Un risque relatif entre ces catégories est attribué ainsi qu'un risque relatif entre la zone des 400 premiers mètres et les 2100 mètres restant. Ces



¹ https://www.theia-land.fr/ceslist/ces-occupation-des-sols/

² https://ge<u>oservices.ign.fr/rpg</u>

³_https://geoservices.ign.fr/bdtopo

risques relatifs font partis des paramètres à renseigner dans RIBESS au même titre que la sensibilité du test de diagnostic et la prévalence maximale attendue.

► Echanges sur les méthodes de diagnostic

La méthode officielle MA039 version1 Détection de Xylella fastidiosa par PCR en temps réel sur plantes hôtes a été publiée en octobre 2015 suite à des travaux méthodologiques et de validation de méthode réalisés à l'Anses LSV. La méthode en est à ce jour à la 5ème version et a intégré au fil de ses révisions les avancées sur la connaissance de la biologie de X. fastidiosa et les avancées méthodologiques relatives à sa détection. Ainsi les tissus initialement analysés étaient composés de pétioles et nervures centrales, puis le prélèvement s'est élargi aux tiges herbacées et rameaux non ligneux pour enfin comprendre également les rameaux ligneux. L'extraction d'ADN reposait initialement sur l'utilisation du kit commercial QuickPick™ Plant DNA (BioNobile) pour l'ensemble des espèces végétales. Suite à des travaux de l'IRHS INRAE, la version 4 de la méthode a intégré la sonication des macérats afin de favoriser l'éclatement des biofilms ainsi qu'un protocole d'extraction basé sur l'utilisation du CTAB/chloroforme pour la détection sur olivier et chêne spp. afin d'améliorer la sensibilité de la méthode sur ces matrices riches en inhibiteurs de la PCR. Des travaux méthodologiques et de validation ont également été menés au LSV sur l'analyse d'échantillons composites (pools) et une réflexion est actuellement en cours en vue d'intégrer ces résultats dans la méthode officielle. Des travaux sont également en cours au LSV en vue de continuer à améliorer la sensibilité diagnostique de la méthode sur certaines matrices.

Le développement à l'IRHS d'un outil multiplex Dupas et al., 2019 couplant détection et identification en une seule étape permet de réduire les temps et coûts d'analyse sur de nombreuses espèces végétales. Cet outil a été validé par l'Anses LSV pour l'identification de la sous-espèce des infections à X. fastidiosa. En complément, la MLST permet d'identifier le ST (sequence type) pour les cas particuliers (nouvel hôte, zone à surveillance renforcée, nouvelle sous-espèce, nouvelle zone).

La méthode officielle MA065 version1 Détection de Xylella fastidiosa par PCR en temps réel sur insectes vecteurs a été publiée en octobre 2020. Elle s'applique aux vecteurs potentiels de X. fastidiosa analysés individuellement ou groupés jusqu'à 10 individus. La détermination de la sous-espèce en présence sur les vecteurs s'effectue par MLST. Les vecteurs potentiels sont identifiés avec la méthode officielle MA064v1 Cette méthode permet de reconnaître les spécimens adultes des vecteurs potentiels les plus significatifs en terme épidémiologique, à savoir P. spumarius et les espèces appartenant aux genres Neophilaenus (Neophilaenusspp.), Cicadella (Cicadella spp.) et Aphrophora (Aphrophora spp.) ainsi que la famille des Cercopidae. En revanche, la méthode officielle MA064v1 ne permet pas la détection par les laboratoires agréés de Draeculacephala robinsoni (nouveau vecteur d'origine nord-américaine détecté en Occitanie). Il conviendrait de modifier la méthode pour l'y ajouter.



▶ Identification de besoins de recherche

Les échanges en GT ont permis d'orienter les travaux de recherche de manière à répondre au mieux aux attentes de terrain et du gestionnaire. L'amélioration de la détection de X. fastidiosa est l'un des axes de recherche qui a ainsi bénéficié de ces échanges. Améliorer la sensibilité diagnostique est l'un des pistes d'étude qui reste d'actualité compte tenu de la grande diversité d'espèces végétales et d'insectes à tester, tout comme la détection tout au long de l'année y compris en période de dormance. Déterminer les performances des outils utilisables en champ, développer des tests sensibles et spécifiques plus rapides et moins onéreux, déterminer les conditions des analyses efficaces des groupes d'individus en sont d'autres. démocratisation des méthodes de séquençage et leur capacité d'analyse sans a priori en font des outils utilisables en diagnostic (Roman-Reyna et al., 2021) potentiellement très précieux en surveillance pour l'identification de nouvelles souches, leur appropriation pour les travaux de routine est à l'étude. Il en est de même pour la dynamique des souches en présence dans les zones infectées.

Du côté de la modélisation du risque à grande échelle spatiale, les avancées du GT ont mis en évidence l'importance de considérer la possibilité des multiples introductions indépendantes dans la région d'étude, ainsi que le rôle de certaines filières, notamment pépinière-horticulture pour l'éventuelle dissémination de la bactérie en dehors du compartiment agricole. Les dernières détections de X. fastidiosa dans des espaces semi-naturels mettent aussi l'accent sur des nouveaux facteurs de risque liés à la présence de friches et d'axes routiers, avec une importante densité d'hôtes non-cultivés. Finalement, l'intégration de l'outil RIBESS permettra de concevoir des stratégies de surveillance basées sur le risque prenant en compte les différents besoins en terme de détection précoce et de délimitation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le GT SXF a développé des outils méthodologiques (cartes de risque, R-Shiny, ...) qui ont permis d'alimenter la rédaction d'instructions techniques et d'orienter les activités de surveillance sur le terrain.

En réunissant le gestionnaire du risque au niveau national, les acteurs en charge de la surveillance sur le terrain, la recherche, les laboratoires et les différents instituts techniques des filières concernées, il permet de croiser des points de vue divers et complémentaires et de fournir des recommandations concrètes pour améliorer la surveillance selon différents objectifs : détection précoce, délimitation d'une zone contaminée, suivi des zones délimitées.

Actuellement, trois sous-groupes poursuivent les travaux sur l'analyse du risque, l'optimisation du diagnostic et la surveillance vectorielle. Ils produiront des cartes de risque mises à jour, des lignes directrices pour le prélèvement sur le terrain et l'analyse en laboratoire et des propositions relatives à la surveillance des insectes vecteurs et de la bactérie.



Enfin, l'analyse des résultats de la surveillance met en lumière les particularités de chaque situation régionale en France, que le gestionnaire peut prendre en compte dans la définition et l'évaluation de l'efficacité des stratégies de lutte. Les travaux du GT SXF fournissent de nouveaux éléments de compréhension de la maladie et font émerger également de nouvelles questions de recherche.

REMERCIEMENTS

Membre du Groupe de travail (par ordre alphabétique) :

André Nicolas (FREDON Occitanie), Balajas Julien (France Olive), Bernard FrançoisMichel (France Olive), Binot Marc (FREDON PACA), Bochnakian Julien (FNPHP), Bonsignour Denis (FranceAgriMer), Bourgouin Bertrand (DGAL), Brun Marie-Josée (SRAL PACA), Colas Christine (SRAL Occitanie), CORRE Caroline (CTIFL), de Jerphanion Pauline (DGAL), Delport Frédéric (DGAL), Duval Amélie (FREDON PACA), Farigoule Pauline (INRAE), Ferrieu Denis (SRAL PACA), Graverol Serge (CA

06), Grosman Jacques (DGAL), Jacques Marie-Agnès (INRAE), Jacquet Patrick (FranceAgriMer), Jullien Jérôme (DGAL), Labruyere Sarah (FREDON France), Le Sourne David (SRAL Corse), Legendre Bruno (Anses), Marjou Marine (INRAE), Martel Isabelle (ADILVA), Martinetti Davide (INRAE), Michel Lucie (INRAE), MOËNNE Morgane (VAL'HOR), Olivier Valérie (Anses), Quillévéré-Hamard Anne (Anses), Reynaud Philippe (Anses), Ruger Charlotte (Anses), Senac Estelle (DDCSPP 2A), SION Ingrid (FREDON Corse), Tassus Xavier (Anses), Tastevin Luc (DDCSPP 2B), Ten Have Sylvia (CTIFL)

