
Etude de la prévalence des vecteurs potentiels naturellement infectés par *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca* dans les oliveraies du sud de l'Italie

Auteur : Rossi, Andrea

Promoteur(s) : Francis, Frédéric

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/2992>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Université de Liège
Gembloux Agro-Bio Tech

**Etude de la prévalence des vecteurs potentiels
naturellement infectés par *Xylella fastidiosa*
subsp.*pauca* dans les oliveraies du sud de l'Italie**

ROSSI ANDREA

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Année académique 2016-2017

Promoteur : Professeur FREDERIC FRANCIS

"Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech."

"Le présent document n'engage que son auteur."

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de l'université de Gembloux Agro-Bio-Tech.

**Etude de la prévalence des vecteurs potentiels
naturellement infectés par *Xylella fastidiosa*
subsp.*pauca* dans les oliveraies du sud de l'Italie**

ROSSI ANDREA

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Année académique 2016-2017

Promoteur : Professeur FREDERIC FRANCIS



L'étude réalisée dans le cadre du présent travail a été rendu possible grâce à l'intervention financière du programme ERASMUS+ et de "Ge.S.Oliv" dans la région italienne des Pouilles.

Remerciements

Cette étude a pu être réalisée grâce aux soutiens et conseils de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier tout particulièrement.

Je remercie tout d'abord mon promoteur, monsieur le Professeur Frédéric Francis pour m'avoir soutenu dans ma volonté de mener cette étude, de m'avoir permis de la réaliser en Italie ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré et les nombreux conseils qu'il m'a prodigués.

Je tiens aussi à remercier les Professeurs Haïssam Jijakli et Cristos Xyloyannis ainsi que les chercheurs Egidio Lardo, Antonia Gallo, Gianluca Bleve et leurs collègues qui ont contribué à la mise en œuvre de cette étude dans le cadre de leur projet italien "Ge.S.Oliv."

Je remercie également les "guinseux" qui ont pimenté ma vie étudiante durant toutes ces années. Mes remerciements vont également à l'unité de statistique de GxABT, à Antoine et à Laurent pour leurs coups de pouce en statistiques. Merci également aux techniciens de laboratoire Thibaut et Nicolas pour les manipulations de laboratoire ainsi qu'à Arno pour les moments passés ensemble en Italie et son talent de cuisinier. Grazie à Alessandra et Marcello pour m'avoir conduit au champ chaque semaine.

Enfin, je remercie mes parents, ma sœur et ma copine pour leur soutien, leur disponibilité et leur patience durant ces années d'étude. Je n'oublie pas mon papa pour son excellence et la qualité de sa relecture.

Je ne peux oublier de remercier ma yaya pour la passion de la terre qu'elle m'a transmise et qui a contribué sans nul doute à mon choix d'étude.

Andrea Rossi

Résumé

En 2013, la bactérie *Xylella fastidiosa* a été détectée pour la première fois en Europe dans la région italienne des Pouilles. Cet agent pathogène bactérien décime les oliviers de la péninsule du Salento avec des conséquences économiques importantes. La bactérie est transmise par des insectes du sous-ordre des Auchenorrhyncha se nourrissant de sèves xylémiennes. Le seul insecte vecteur européen identifié jusqu'à présent est *Philaenus spumarius*. Les mesures d'éradication de *Xylella fastidiosa* ordonnées par la Commission Européenne ne semblent pas stopper l'expansion de la bactérie dans le sud de l'Italie. Il existe peu d'études sur les vecteurs potentiels européens de *X.fastidiosa* et les connaissances sur le vecteur *P.spumarius* en Europe en sont à leur début. Afin de comprendre les liens entre la bactérie et un nouvel insecte modèle invasif en Europe, un test préliminaire d'acquisition sur diètes artificielles a été réalisé sur *Halyomorpha halys* au laboratoire de GxABT. A ce stade, le test préliminaire n'a pas permis de comprendre les interactions entre ces deux organismes. Afin d'enrichir les connaissances, les études de la prévalence de *P.spumarius* et de la dynamique des populations de *P.spumarius*, *N.campestris* ainsi que des autres Auchenorrhyncha dont les vecteurs potentiels de *X.fastidiosa* ont été réalisées dans deux oliveraies des environs de Lecce dans le cadre du projet italien "Ge.S.Oliv.". Malgré l'hétérogénéité des deux oliveraies, les connaissances actuelles sur la dynamique des Auchenorrhyncha dans les oliveraies du Salento au printemps semblent globalement se confirmer par cette étude. Cependant, la population des insectes étudiés semble diminuer dans les arbres sévèrement taillés au contraire des arbres non-taillés et augmenter dans une zone d'enherbement utilisée comme refuge après labour de la parcelle. Ces observations nécessiteraient une recherche approfondie afin de développer une stratégie push-pull avec contrôle cultural du vecteur. Par ailleurs, la prévalence de *P.spumarius* infectés par la bactérie dans les oliveraies étudiées présente un taux inférieur à celui observé près de l'épicentre de l'épidémie aux alentours de Gallipoli. Afin d'alimenter les connaissances sur les vecteurs potentiels de la *X.fastidiosa*, il serait intéressant d'identifier taxonomiquement les espèces des Auchenorrhyncha capturées sur les oliviers infectés ainsi que de détecter la présence de la bactérie dans ceux-ci et de pouvoir tester ainsi leur éventuelle capacité vectrice.

Mots-clés : *Xylella fastidiosa*, *Philaenus spumarius*, Auchenorrhyncha, vecteurs, oliviers, dynamique, prévalence.

Abstract

In 2013, the bacterium *Xylella fastidiosa* was detected for the first time in Europe in the Italian region of Puglia. This bacterial pathogen decimates the olive trees of the Salento peninsula with important economic consequences. The bacterium is transmitted by insects of the suborder Auchenorrhyncha feeding on xylem sap. The only European vector insect identified so far is *Philaenus spumarius*. The eradication measures of *X.fastidiosa* ordered by the European Commission do not seem to stop the spread of the bacterium in southern Italy. There are few studies on the potential European vectors of *X.fastidiosa* and knowledge about the vector *P.spumarius* in Europe is in its early stages. In order to understand the links between the bacterium and a new invasive model insect in Europe, a preliminary acquisition test on artificial diets was carried out on *Halyomorpha halys* in the GxABT laboratory. At this stage, the preliminary test did not understand the interactions between these two organisms. In order to enrich knowledge, studies on the prevalence of *P.spumarius* and the population dynamics of *P.spumarius*, *N.campestris* and other Auchenorrhyncha, whose potential vectors of *X.fastidiosa*, were carried out in two olive groves in the surroundings of Lecce within the framework of the Italian project "Ge.S.Oliv.". Despite the heterogeneity of the two olive groves, the current knowledge on Auchenorrhyncha dynamics in Salento olive groves in the spring seems to be confirmed by this study. However, the insect population studied appears to decrease in trees severely pruned in contrast to unpruned trees and increase in a grassland used as refuge after tillage of the plot. These observations could require thorough research in order to develop a push-pull strategy with cultural control of the vector. Moreover, the prevalence of *P.spumarius* infected by the bacterium in the studied olive groves is lower than that observed near the epicenter of the epidemic in the surroundings of Gallipoli. In order to feed knowledge of the potential vectors of *X.fastidiosa*, it would be interesting to taxonomically identify the Auchenorrhyncha species caught on the infected olive trees as well as to detect the presence of the bacterium in these and to be able to test their possible transmitting capacity.

Keywords : *Xylella fastidiosa*, *Philaenus spumarius*, Auchenorrhyncha, vectors, olive trees, dynamics, prevalence.

Table des matières

I.	INTRODUCTION	1
II.	PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1	Le secteur agricole en Italie	2
1.1	L'oléiculture italienne	2
1.1.1	Importance économique dans la région des Pouilles.....	3
1.1.2	Maladie émergente	3
2	Identification de <i>Xylella fastidiosa</i>	3
2.1	Taxonomie	4
2.2	Répartition géographique	5
2.2.1	Mondiale.....	5
2.2.2	Europe	6
2.3	Statut légal du pathogène et mesures de contrôle.....	7
2.4	Biologie du pathogène	7
2.4.1	Colonisation dans les plantes hôtes	8
2.4.2	Colonisation dans les insectes vecteurs.....	9
2.5	Plantes hôtes de <i>Xylella fastidiosa</i>	10
2.5.1	Plantes hôtes en Europe.....	10
2.6	Symptômes	10
2.7	Transmission de <i>Xylella fastidiosa</i>	11
2.7.1	Comportement alimentaire des vecteurs	12
2.7.2	Mécanisme d'expulsion-salivation	12
3	Identifications des vecteurs	13
3.1	Vecteurs non-européens de <i>X.fastidiosa</i>	13
3.2	Vecteur européen de <i>X.fastidiosa</i>	15
3.2.1	Description générale.....	15
3.2.2	Stades de développement	16
3.2.3	Dynamique comportementale.....	17
3.2.4	Dégâts directs	18

3.2.5	Dégâts indirects	18
3.2.6	Répartition géographique	18
3.3	Vecteurs européens potentiels de <i>X.fastidiosa</i>	19
3.3.1	Dans la péninsule du Salento	19
III.	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	21
IV.	MATERIEL ET METHODES	22
1	Test préliminaire d'acquisition de la bactérie <i>X.fastidiosa</i> en utilisant un nouveau modèle, <i>Halyomorpha halys</i> (Stål)	22
1.1	Introduction	22
1.2	Matériel et méthodes	23
1.2.1	Test de survie aux diètes artificielles	23
1.2.2	Test préliminaire d'acquisition de la bactérie <i>X.fastidiosa</i> à travers une diète artificielle	24
1.2.3	Extraction ADN.....	26
1.2.4	Réactions et conditions de la PCR	26
2	Etude de la dynamique de <i>Philaenus spumarius</i> , <i>Neophilaenus campestris</i> ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des <i>Auchenorrhyncha</i>	28
2.1	Introduction	28
2.2	Matériel et méthodes	29
2.2.1	Cartographie des niveaux d'infection des oliviers.....	30
2.2.2	Evaluation de l'abondance de <i>Philaenus spumarius</i> , <i>Neophilaenus campestris</i> et des insectes du sous-ordre des Auchenorrhyncha (dont les vecteurs potentiels font partie) dans les deux oliveraies expérimentales.....	34
2.2.3	Identification des insectes	36
3	Evaluation de la prévalence de <i>Philaenus spumarius</i> naturellement infecté par <i>X.fastidiosa</i>	36
3.1	Introduction	36
3.2	Matériel et méthodes	36
3.2.1	Extraction ADN et PCR	36

V. RESULTATS	39
1 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie <i>X.fastidiosa</i> en utilisant un nouveau modèle : <i>Halyomorpha halys</i> (Stål)	37
1.1 Test de survie aux diètes artificielles.....	37
1.2 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie <i>X.fastidiosa</i> à travers une diète artificielle	37
2 Etude de la dynamique de <i>Philaenus spumarius</i> , <i>Neophilaenus campestris</i> ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des <i>Auchenorrhyncha</i>	37
2.1 Analyses statistiques.....	37
2.2 Parcelle expérimentale de Vernole	38
2.2.1 Abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers.....	38
2.2.2 Abondance relative des insectes capturés dans la strate herbacée	39
2.2.3 Abondance relative des insectes capturés dans les canopées	40
2.2.4 Abondance de <i>P.spumarius</i> dans l'olivieraie.....	42
2.3 Parcelle expérimentale de Squinzano	43
2.3.1 Abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers.....	43
2.3.2 Abondance relative des insectes capturés dans la strate herbacée	44
2.3.3 Abondance relative des insectes capturés dans les canopées	45
2.3.4 Abondance de <i>P.spumarius</i> dans l'olivieraie.....	47
3 Evaluation de la prévalence de <i>Philaenus spumarius</i> L. naturellement infecté par <i>X.fastidiosa</i>	48
3.1 Parcelle expérimentale de Vernole	48
3.1.1 Prévalence de <i>X.fastidiosa</i> dans <i>P.spumarius</i>	48
3.2 Parcelle expérimentale de Squinzano	49
3.2.1 Prévalence de <i>X.fastidiosa</i> dans <i>P.spumarius</i>	49
VI. DISCUSSION	51
1 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie <i>X.fastidiosa</i> en utilisant un nouveau modèle : <i>Halyomorpha halys</i> (Stål)	51
2 Etude de la dynamique de <i>P.spumarius</i> , <i>N.campestris</i> ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des <i>Auchenorrhyncha</i>	53
3 Evaluation de la prévalence de <i>P.spumarius</i> naturellement infecté par <i>X.fastidiosa</i>	56

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	58
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	60
IV. ANNEXES	67

Table des Figures

Figure 1. Distribution mondiale des sous-espèces de <i>Xylella Fastidiosa</i> (EFSA, 2015).....	5
Figure 2. Nouvelle zone de démarcation pour contrôler la bactérie <i>Xylella fastidiosa</i> dans la région des Pouilles (Commission européenne, 2017b)	6
Figure 3. Biofilm de <i>Xylella</i> (jaune) dans un vaisseau xylémien de vigne (vert). (Electron Microscopy Laboratory, U.C. Berkeley).....	8
Figure 4. Modèle hypothétique de la colonisation de <i>Xylella fastidiosa</i> dans des cicadelles vectrices (Killiny & Almeida, 2009).....	9
Figure 5. Syndrome du déclin rapide de l'olivier (CoDiRO).	11
Figure 6- <i>Philaenus spumarius</i> L., (Walwyn, 2008).....	15
Figure 7. Amas spumeux sécrété par une larve de <i>P.spumarius</i> (Istrice, 2004)	16
Figure 8. Dynamique des cercopes dans l'agro-écosystème d'olivier dans la péninsule du Salento en Italie (Porcelli, 2015).....	17
Figure 9 - Dispositif expérimental : test de survie d' <i>Halyomorpha halys</i> sur diète artificielle de jus de plantes de fève (Rossi, 2017).....	24
Figure 10 - Test préliminaire d'acquisition de <i>X.fastidiosa</i> par <i>Halyomorpha halys</i> (Rossi, 2017).....	25
Figure 11 - Période de rétention d' <i>Halyomorpha halys</i> avec des morceaux de pomme bio (Rossi, 2017)	26
Figure 12 - Parcelle expérimentale de Squinzano (Ge.S.Oliv., 2017)	29
Figure 13 - Parcelle expérimentale de Vernole (Ge.S.Oliv., 2017)	30
Figure 14 - Schéma du niveau d'infection des oliviers de Squinzano (Rossi, 2017)	32
Figure 15 - Schéma du niveau d'infection des oliviers de Vernole (Rossi, 2017)	33
Figure 16 - Végétation autour des troncs d'olivier à Vernole (Rossi, 2017).....	35

Figure 17 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée et dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole	38
Figure 18 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée du champ expérimental de Vernole	39
Figure 19 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole.....	40
Figure 20 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans les canopées infectés et saines des oliviers du champ expérimental de Vernole	41
Figure 21 - Evolution du nombre moyen de cercopes des prés (<i>P.spumarius</i>) collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée et dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole.....	42
Figure 22 - Evolution du nombre moyen d'insectes capturés hebdomadairement par 10 coups de filet dans l'agro-écosystème d'olivier de Squinzano.....	43
Figure 23 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée du champ expérimental de Squinzano.	44
Figure 24 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la canopée des oliviers du champ expérimental de Squinzano.....	45
Figure 25 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la canopée des oliviers hors du champ expérimental de Squinzano.	46
Figure 26 - Evolution du nombre moyen de cercopes des prés (<i>P.spumarius</i>) collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée, dans les canopées des oliviers du champ expérimental et dans les canopées des oliviers en dehors de la parcelle de Squinzano.	47
Figure 27 - Evolution du nombre de <i>P.spumarius</i> infectés et non-infectés par <i>X.fastidiosa</i> dans les canopées et la strate herbacée du champ expérimental de Vernole	48
Figure 28 - Evolution du nombre de <i>P.spumarius</i> infectés et non-infectés par <i>X.fastidiosa</i> dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole	49
Figure 29 - Evolution du nombre de <i>P.spumarius</i> infectés et non-infectés par <i>X.fastidiosa</i> dans les canopées des oliviers hors du champ expérimental de Squinzano.	50
Figure 30 - Coloration de Gram des bactéries cultivées à partir de celles présentes dans les diètes artificielles (Objectif 100x) (Fievet, 2017)	52

Table des tableaux

Tableau 1 - Dix premières cultures (en tonnes) en Italie (FAOSTAT, 2017).....	2
Tableau 2 - Vecteurs de <i>X.fastidiosa</i> sur le continent américain: principaux groupes d'insectes et espèces vectrices les plus importantes (Redak et al., 2004).....	14
Tableau 3 - Présentation du vecteur actuel et des espèces de vecteurs potentiels les plus importantes en Europe (EFSA, 2015)	20
Tableau 4 - Mélange réactionnel PCR <i>X.fastidiosa</i> (Bleve,2017)	27
Tableau 5 - Conditions PCR primers RST-31 et RST-33	27
Tableau 6 - Nombre de <i>P.spumarius</i> infectés par <i>X.fastidiosa</i> en fonction du lieu de capture.	48
Tableau 7 - Nombre de <i>P.spumarius</i> infectés par <i>X.fastidiosa</i> en fonction du lieu de capture.	50

I. INTRODUCTION

Le commerce et les échanges internationaux se sont beaucoup développés ces dernières décennies dans le monde entier. Le corollaire de ces échanges internationaux comme les frontières physiques de certains organismes et favorise donc leur introduction sur des territoires où ils étaient initialement absents. L'introduction de ces organismes de quarantaine provoque parfois des conséquences économiques et environnementales importantes. L'Union européenne possède un régime phytosanitaire unique en autorisant la circulation des végétaux s'ils proviennent de régions exemptes d'organismes nuisibles ou s'ils ont subi un traitement approprié. Malgré ces mesures européennes, la bactérie *Xylella fastidiosa* a été détectée pour la première fois en Europe en 2013 dans la région italienne des Pouilles. La bactérie décime les oliviers de la péninsule du Salento et mine l'économie de la région qui est la première région oléicole d'Italie. Ce pathogène est originaire du continent américain où il s'attaque à de nombreuses plantes hôtes. *X.fastidiosa* est transmise par des insectes appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha se nourrissant de sève xylémienne. Les vecteurs américains sont absents du territoire européen à l'exception de *P.spumarius* qui s'est avéré être le vecteur de la sous-espèce de *X.fastidiosa* établie dans les oliveraies de la région des Pouilles. Il existe actuellement peu d'informations sur les vecteurs potentiels européens et les connaissances sur le vecteur *P.spumarius* en Europe en sont à leur début.

Quatre ans après son identification en Europe, les mesures d'éradication de *Xylella fastidiosa* ordonnées par la commission européenne ne semblent pas stopper l'expansion de la bactérie dans le sud de l'Italie. Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances avec une démarche multidisciplinaire tant du point de vue phytosanitaire que du point de vue entomologique sur l'acquisition et la transmission de la bactérie aux plantes hôtes ainsi que sur les vecteurs potentiels afin d'améliorer les mesures de contrôles des vecteurs.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'étudier les liens entre la bactérie et un nouvel insecte modèle invasif en Europe, *Halyomorpha halys*. Nous avons également étudié, dans deux agro-écosystèmes d'oliviers des environs de Lecce, la dynamique et la prévalence de l'infection du vecteur européen identifié, *P.spumarius* ainsi que la dynamique du vecteur potentiel *N.campestris*, et celle d'autres insectes du sous-ordre des Auchenorrhyncha au travers du projet italien "Ge.S.Oliv". Ce projet multidisciplinaire, piloté par le Prof. Xyloyannis de l'Université de Basilicate et la Région des Pouilles, est fondé sur la gestion durable et écologique de l'oléiculture afin de prévenir et contrôler l'infection de la *Xylella fastidiosa* dans le Salento et dans la zone limitrophe à risque de contamination.

II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Le secteur agricole en Italie

L'Italie est le troisième pays agricole de l'Union européenne (42 milliards d'euros de chiffre d'affaires en 2014) après la France et l'Allemagne (Ministère français de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2015). La valeur ajoutée de l'agriculture représente 2,1% du PIB en Italie en 2016 (La banque mondiale, 2017a). En 2015, le secteur agricole italien employait 3,75% de la population active du pays alors que la moyenne pour l'Union européenne était de 4,51% (La banque mondiale, 2017b).

Le maïs est la principale culture nationale en terme de volume de production avec plus de 9 millions de tonnes en 2014. L'olive est également une culture emblématique du pays bien qu'elle connaisse une baisse de production de 45% en 2014 due aux conditions climatiques défavorables et à la présence de la bactérie *Xylella fastidiosa* (Wells) dans la région des Pouilles (Tableau 1) (OlioPuglia, 2014 ; FAOSTAT, 2017).

Tableau 1 - Dix premières cultures (en tonnes) en Italie (FAOSTAT, 2017).

Productions végétales	2010	2011	2012	2013	2014
Maïs	8.495.940	9.752.592	7.860.123	7.899.617	9.239.545
Blé	6.849.858	6.641.807	7.654.248	7.312.025	7.141.926
Raisins	7.787.800	7.444.881	6.918.044	8.010.364	6.930.794
Tomates fraîches	6.024.800	5.950.215	5.592.302	5.321.249	5.624.245
Sucre de betterave	3.550.100	3.547.947	2.492.466	2.159.381	3.784.435
Pommes	2.204.972	2.411.201	1.991.312	2.216.963	2.473.608
Légumes frais	2.100.000	2.100.000	2.000.000	2.150.000	2.150.000
Olives	3.170.700	3.182.204	3.017.537	2.940.545	1.963.676
Oranges	2.393.663	2.469.939	1.770.503	1.700.778	1.668.709
Riz paddy	1.516.400	1.490.150	1.601.478	1.433.111	1.386.100

1.1 L'oléiculture italienne

La culture de l'olivier est une activité culturellement et économiquement importante. En effet, l'Italie est le deuxième producteur mondial d'olives (FAOSTAT, 2017) . En 2017, la superficie oléicole totale est de 1 075 000 ha et la production d'huile d'olive représentait 3,151 milliards d'euros et 2,4% de la valeur de la production agricole italienne en 2016. Il existe 825 000 fermes oléicoles, 5000 huileries, 10 raffineries d'huile d'olive et 38 unités d'extraction d'huile de grignons d'olive (Ismea, 2016 ; Conseil oléicole international, 2017). Parmi les 500 variétés d'olivier que compte l'Italie, seulement 45 d'entre elles sont utilisées

pour produire plus de 90% de l'huile d'olive nationale. Les 3 variétés les plus diffusées dans la région des Pouilles sont la *Coratina*, l'*Ogliarola* et la *Cellina di Nardo* (Conseil oléicole international, 2017).

1.1.1 Importance économique dans la région des Pouilles

La région des Pouilles est la plus importante zone oléicole du pays (45% de la superficie totale oléicole) et consacre la plus grande surface à l'oléiculture biologique, avec 32,0% du total national et 15,0% de la surface régionale (Conseil oléicole international, 2017). L'oléiculture apulienne représentait 11,6% (soit 522 millions d'euros) de la valeur totale de la production agricole dans la région ainsi que 30,0% de la valeur de la production oléicole en Italie en 2013 (Journal officiel de l'Union européenne, 2016).

1.1.2 Maladie émergente

En 2010, les oliviers de la côte ouest de la péninsule du Salento ont commencé à souffrir de symptômes étranges de dessèchement menant parfois à la mort de l'arbre. Ce mal inconnu a été surnommé "syndrome du déclin rapide de l'olivier" ou CoDiRO qui est l'abréviation de l'italien "Complesso del disseccamento rapido dell'olivo".

Trois années plus tard, la zone affectée s'étendait sur plus de 10.000 hectares. Cette même année, l'agent responsable de ce fléau a été identifié comme étant la bactérie *Xylella fastidiosa* (Wells) (Saponari et al., 2013).

2 Identification de *Xylella fastidiosa*

Newton Pierce est le premier scientifique à entamer la recherche sur les maladies causées par la bactérie *Xylella fastidiosa*. Ce bactériologiste a étudié le phénomène de "maladie des vignes californiennes" ou "maladie de Anaheim" en Californie. Bien qu'incapable d'identifier l'agent causal de la maladie, il a émis différentes hypothèses menant à la conclusion qu'un agent infectieux microscopique causait la maladie d'Anaheim. Il a aussi suggéré qu'un insecte vecteur pourrait être impliqué dans la dispersion du pathogène. Malgré les efforts des scientifiques, l'épidémie a eu des conséquences dévastatrices sur l'industrie de la vigne dans le sud de la Californie détruisant 14.000 ha de culture (Pierce, 1892). En 1939, la maladie fût nommée "maladie de Pierce". L'agent pathogène était assimilé à un virus jusqu'en 1971 (Hopkins, 1979). Peu de temps après, Goheen et ses collègues (1972) et Hopkins & Mollenhauer (1973) ont reconnu l'agent de la maladie de Pierce comme étant une bactérie qui sera nommée *Xylella fastidiosa* dix ans plus tard par Wells et al. (1987).

Les maladies économiquement importantes provoquées par *Xylella fastidiosa* sont la maladie de Pierce de la vigne (Davis et al., 1978), l'échaudure des feuilles du pêcher (Wells et al., 1983), la chlorose panachée des agrumes (Chang et al., 1993), la brûlure foliaire du

prunier (Raju et al., 1982), la brûlure des feuilles de café (Li et al., 2001), des feuilles d'amandier (Mircetich et al., 1976) et des feuilles de pacanier (Sanderlin & Heyderich-Alger, 2000) ainsi que le syndrome du déclin rapide de l'olivier (Saponari et al., 2013).

2.1 Taxonomie

Règne : *Bacteria*

Division: *Proteobacteria*

Classe: *Gamma Proteobacteria*

Ordre: *Xanthomonadales*

Famille: *Xanthomonadaceae*

Genre: *Xylella*

Espèce: *X. fastidiosa*

Xylella fastidiosa est une bactérie Gram négative, strictement aérobie et limitée au tissu du xylème. Ce pathogène appartient à la famille des *Xanthomonadaceae* (Janse & Obradovic, 2010).

Le genre *Xylella* est constitué d'une seule espèce, *X. fastidiosa*. Cependant, il existe 4 sous-espèces reconnues de *X. fastidiosa* : *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex* et *sandyi* (Schaad et al., 2004 ; Schuenzel et al., 2005). Plusieurs autres sous-espèces de *Xylella* identifiées n'ont pas encore été reconnues officiellement par l'International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria" (ISPP-CTPPB) (EFSA, 2015).

La sous-espèce *fastidiosa* :

C'est le seul groupe génétique qui cause la maladie de Pierce dans les vignes des USA (Nunney et al., 2010). De plus, cette sous-espèce est plus diversifiée en Amérique centrale, il est donc opportun de penser qu'il s'agit donc d'une introduction aux Etats-Unis (Nunney et al., 2010). L'introduction de cette sous-espèce à Taiwan a provoqué une épidémie dans les vignobles à partir de 2002 (Su et al., 2013). Cette sous-espèce est également responsable de cette maladie dans d'autres plantes hôtes comme l'amandier (Chen et al., 2005).

La sous-espèce *pauca*:

En Amérique du Sud, la sous-espèce *pauca* provoque la chlorose panachée des agrumes (Chang et al., 1993) ainsi que la brûlure des feuilles de café (Almeida et al., 2008). Cette sous-espèce est également responsable du syndrome du déclin rapide de l'olivier "CoDiRO" dans la région des Pouilles en Italie (Saponari et al., 2013).

La sous-espèce *multiplex* :

La sous-espèce *multiplex* possède jusqu'à présent la gamme la plus large d'espèces de plantes hôtes présentant des symptômes de maladie (Nunney et al., 2013). Elle est régulièrement isolée dans les amandiers souffrant de la maladie de brûlure des feuilles (Chen et al., 2005 ; Mircetich et al., 1976). *Multiplex* est responsable de maladies dans de nombreuses cultures pérennes telles que les pêchers (Wells et al., 1983), les pruniers (Raju et al., 1982), les liquidambers (Hernandez-Martinez, Cooksey, & Wong, 2009).

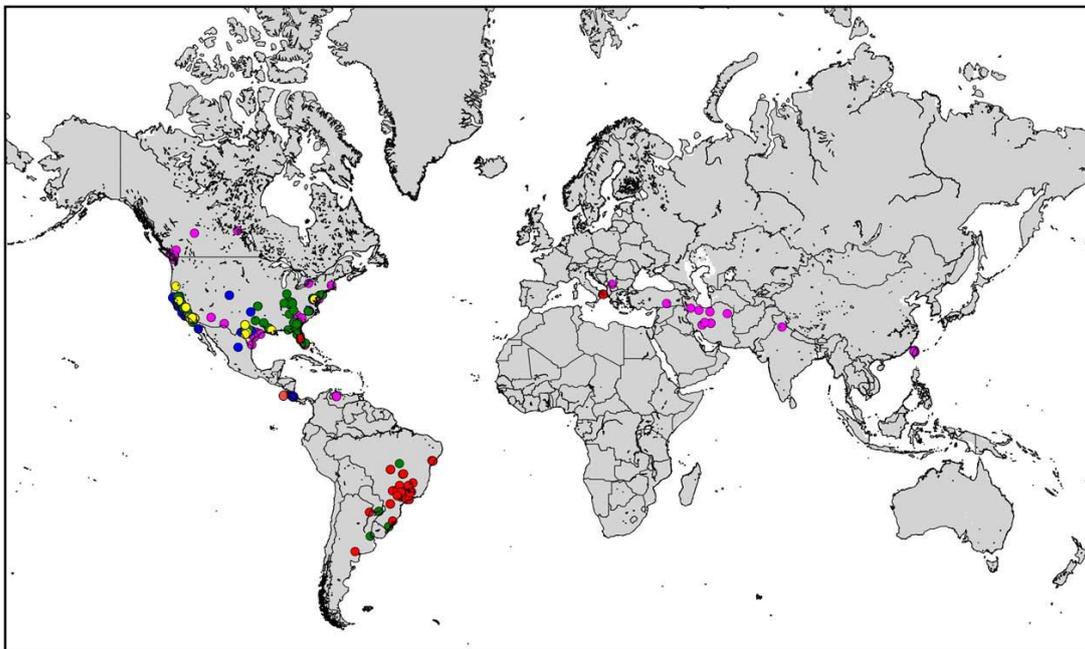
La sous-espèce *sandyi* :

La sous-espèce *sandyi* est très peu référencée et sa biologie n'est pas très connue (Yuan et al., 2010). Néanmoins, elle s'attaque aux oléandres provoquant la brûlure de feuilles (Purcell et al., 1999).

2.2 Répartition géographique

2.2.1 Mondiale

La bactérie est présente dans de nombreux milieux tropicaux, subtropicaux, tempérés et méditerranéens principalement sur le continent américain où toutes les sous-espèces sont observées (Figure 1) (EFSA, 2015).



Code couleur : bleu = *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*; vert = *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*; rouge = *X. fastidiosa* subsp. *pauca*; jaune = *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*; fuchsia = *X. fastidiosa* subsp. non-identifiée)

Figure 1. Distribution mondiale des sous-espèces de *Xylella Fastidiosa* (EFSA, 2015).

2.2.2 Europe

La présence de *X.fastidiosa* en Europe est relativement récente, observée en 2013. Depuis lors, de nouveaux foyers sont régulièrement détectés dans de nouveaux états-membres mais ne concernent pas la sous-espèce présente en Italie (EPPO, 2016).

2.2.2.1 Italie

La bactérie *X. fastidiosa* a été identifiée pour la première fois en Europe en 2013 dans la région italienne des Pouilles. La présence de la sous-espèce *pauca* a été confirmée dans des plants d'amandiers (*Prunus dulcis* Mill.), d'oléandres (*Nerium oleander* L.) et d'oliviers (*Olea europea* L.) présentant des symptômes de la maladie. En 2013, la zone contaminée s'étendait sur près de 10.000 hectares (Saponari et al., 2013). L'épicentre de l'arrivée de la bactérie semble être ciblé aux alentours de la ville de Gallipoli. La sous-espèce *pauca* proviendrait du Costa Rica (Giampetruzzi et al., 2015). La bactérie est actuellement toujours présente et confinée à la région des Pouilles (Figure 2).

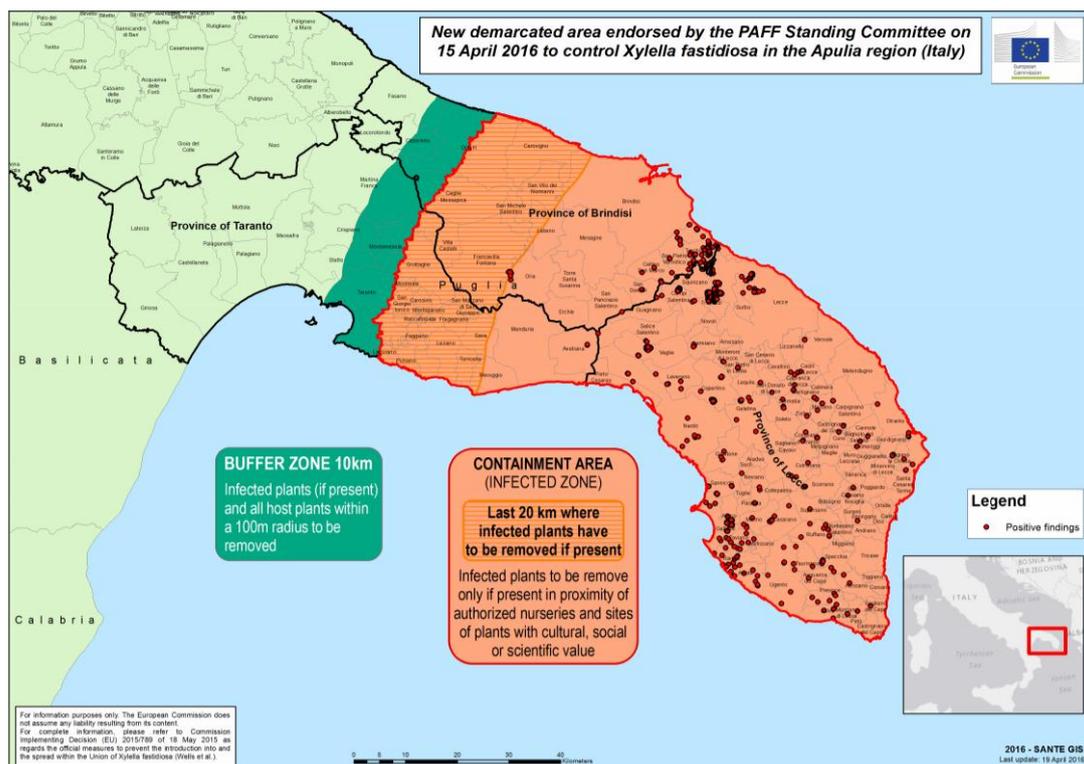


Figure 2. Nouvelle zone de démarcation pour contrôler la bactérie *Xylella fastidiosa* dans la région des Pouilles (Commission européenne, 2017b)

2.3 Statut légal du pathogène et mesures de contrôle

Xylella fastidiosa fait partie de la liste A1(ravageur absent du territoire) de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP). Les organismes inscrits dans cette liste sont soumis à une régulation en tant qu'organisme de quarantaine (EPPO, 2016).

En Italie, la bactérie est soumise à des mesures de confinement en zone infectée et à des mesures d'éradication en zone tampon et dans le nord de la zone infectée, qui sont dictées par la commission européenne . Dans la région des Pouilles, les plantes infectées, détectées dans les 20 derniers kilomètres de la zone infectée (en orange dans la Figure 2), doivent être détruites. Dans la zone tampon (en vert foncé dans la Figure 2), toutes les plantes hôtes retrouvées dans un rayon de 100 mètres autour d'une plante infectée doivent être détruites (Commission européenne, 2017b).

2.4 Biologie du pathogène

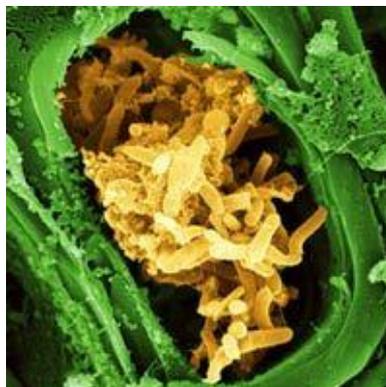
Xylella fastidiosa est capable de s'installer et de se développer dans le xylème des plantes hôtes ainsi que dans l'intestin des insectes se nourrissant de sève brute (Chatterjee, Almeida, & Lindow, 2008). Sa température optimale de croissance est de 26-28°C (Janse & Obradovic, 2010).

2.4.1 Colonisation dans les plantes hôtes

La bactérie colonise les vaisseaux xylémiens des plantes hôtes où elle peut se déplacer vers le haut comme vers le bas de la plante (Almeida et al., 2001; Meng et al., 2005). Elle peut également circuler dans les vaisseaux voisins, à travers les ponctuations du vaisseau xylémien, dû à la dégradation de leur membrane déclenchée par un signal diffus de la bactérie (Newman et al., 2004). Elle se retrouve aussi dans les racines (Janse & Obradovic, 2010).

La pathogénécité de *X.fastidiosa* montre des similarités avec *Xanthomonas campestris* (Pammel). En effet, elle produit des facteurs pathogéniques comme des adhésines pour son attachement. A partir d'un certain niveau d'infection, *X.fastidiosa* produit des exopolysaccharides (EPS) qui sont similaires à la gomme xanthane produite par *X.campestris* et permettent la formation d'un biofilm. Des structures protéiques filamenteuses disposées régulièrement à la surface de la paroi bactérienne (pili) jouent également un rôle important dans la formation de ce biofilm et dans l'agrégation des cellules (Janse & Obradovic, 2010).

Les vaisseaux xylémiens peuvent être obstrués par ces biofilms bactériens (Figure 3) empêchant ainsi le passage de la sève brute et provoquant les symptômes de dessèchement (Janse & Obradovic, 2010). Actuellement, il n'existe aucun moyen de lutte curative contre cette bactérie phytopathogène.



**Figure 3. Biofilm de *Xylella* (jaune) dans un vaisseau xylémien de vigne (vert).
(Electron Microscopy Laboratory, U.C. Berkeley)**

2.4.2 Colonisation dans les insectes vecteurs

L'insecte peut acquérir la bactérie une fois qu'il s'est alimenté de sève brute d'une plante infectée. La bactérie s'attache et se multiplie dans le pre-cibarium (canal alimentaire) et le cibarium ("chambre de pompage") de l'intestin d'un insecte vecteur (Hill & Purcell, 1995). L'agent pathogène est donc non-circulant dans l'insecte (Purcell & Finlay, 1979). L'efficacité de l'acquisition augmente au fur et à mesure que le nombre de cellules bactériennes vivantes dans la plante hôte augmente (Hill & Purcell, 1997). Certains insectes vecteurs peuvent préférentiellement se nourrir de tissu végétal qui abrite des populations inférieures de *X. fastidiosa* ce qui entraînerait une plus faible probabilité d'acquisition d'agents pathogènes (Daugherty, Lopes, & Almeida, 2010).

Killiny & Almeida (2009) ont proposé un modèle conceptuel pour décrire les étapes de la colonisation de *X. fastidiosa* dans un insecte (Figure 4). Une fois ingérées par l'insecte, les cellules bactériennes peuvent adhérer latéralement à la cuticule de la partie antérieure du canal alimentaire grâce à des protéines liantes comme HxfA et HxfB (Fig 5 A et B). De plus en plus de cellules s'y attachent et la surface de contact augmente. Les cellules peuvent produire de grande quantité d'exopolysaccharides (EPS) afin de former un biofilm (Fig C). Les cellules au centre du biofilm s'attachent plus fortement grâce aux pili de type I de manière à former un biofilm mature. De nouvelles cellules non attachées sont produites et peuvent se détacher du biofilm afin de circuler dans le canal alimentaire et infecter une plante hôte saine lors du processus d'alimentation de l'insecte (Fig D).

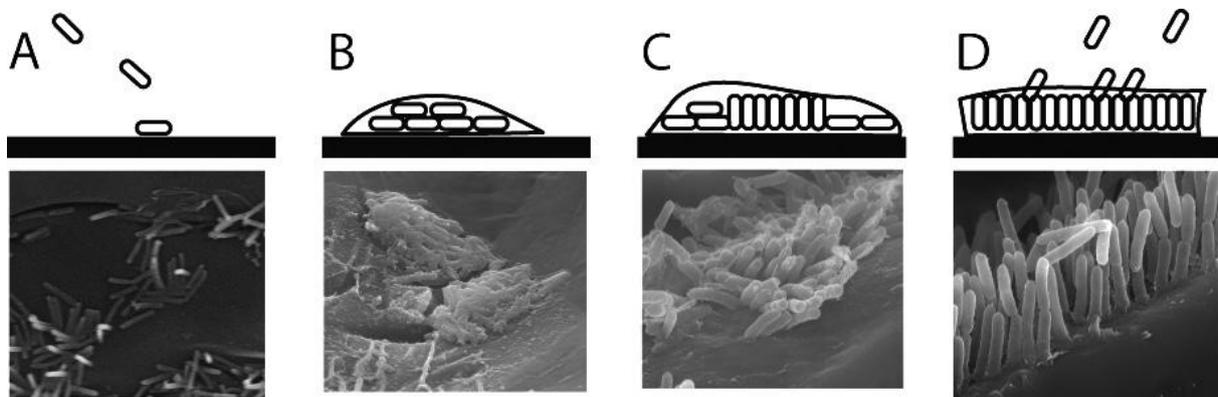


Figure 4. Modèle hypothétique de la colonisation de *Xylella fastidiosa* dans des cicadelles vectrices (Killiny & Almeida, 2009).

2.5 Plantes hôtes de *Xylella fastidiosa*

La gamme de plantes hôtes de *X.fastidiosa* est très large et issue de 63 familles botaniques, 193 genres et 309 espèces. La plupart de ces plantes hôtes sont des dicotylédones. Les différentes sous-espèces de *X.fastidiosa* ont pour la plupart des plantes hôtes différentes (EFSA, 2015).

2.5.1 Plantes hôtes en Europe

En Europe, les plantes hôtes connues de la sous-espèce *pauca* sont l'olivier (*Olea europea* L.), l'oléandre (*Nerium oleander* L.), la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* L.) (Cariddi et al., 2014) et l'amandier (*Prunus dulcis* Mill.) (Saponari et al., 2013).

D'autres plantes sont susceptibles d'abriter la bactérie sur le territoire européen (Annexe A) (Commission européenne, 2017a).

2.6 Symptômes

La présence de *X.fastidiosa* dans la plante peut être asymptomatique ou provoquer une diversité de symptômes allant parfois jusqu'à la mort du végétal. Cette variation des symptômes est due à un grand nombre d'espèces de plantes hôtes, à la diversité de l'agent pathogène et aux différentes conditions climatiques (EFSA, 2015). La plupart des plantes infectées par la bactérie ne présente aucune manifestation. Les symptômes présentent généralement un flétrissement puis un dessèchement partant du bord des feuilles et des brûlures foliaires (Figure 5) (Janse & Obradovic, 2010).

Dans certains cas, surtout sur les oliviers relativement jeunes (50-60 ans), les symptômes peuvent être limités à la dessiccation de petites branches. En revanche, les oliviers centenaires semblent être les plus gravement touchés par un syndrome sévère de dessiccation s'étendant dans toute la canopée et causant la mort des arbres (Cariddi et al., 2014). Les symptômes sont plus importants vers la fin de l'été lorsque la demande en eau, maximale, n'est pas satisfaite dû aux vaisseaux xylémiens bloqués par les biofilms bactériens (Chatterjee et al., 2008).



Figure 5. Syndrome du déclin rapide de l'olivier (CoDiRO).

2.7 Transmission de *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa est transmise par des insectes, se nourrissant de sève xylémienne, qui appartiennent tous à l'ordre des Hémiptères et au sous-ordre des Auchenorrhyncha (Redak et al., 2004). Ces insectes possèdent des pièces buccales avec un rostre court et deux stylets permettant d'atteindre les vaisseaux du xylème afin de se nourrir de sève brute. La valeur nutritionnelle de la sève xylémienne est très pauvre, c'est pourquoi les insectes suceurs de sève brute en ingèrent de grande quantité (Raven, 1984).

La bactérie est persistante dans l'insecte adulte contaminé, cela signifie qu'ils sont capables de transmettre le pathogène probablement jusqu'à leur mort (Almeida & Purcell, 2003). Il n'y a pas de transmission à travers les différents stades de développement de l'insecte, ce qui signifie que les insectes infectés se débarrassent de la bactérie à chaque mue. De plus, les femelles infectées ne transmettent pas la bactérie à leurs progénitures. (Purcell & Finlay, 1979) (Almeida & Purcell, 2003). L'efficacité de la transmission augmente lorsque la période d'acquisition et la période d'inoculation augmentent (Cornara et al., 2016). Certains insectes vecteurs peuvent discriminer les plantes infectées et symptomatiques, entraînant l'évitement de ces plantes et, en fin de compte, diminuant la transmission de la bactérie (Daugherty et al., 2010 ; Zeilinger & Daugherty, 2014). L'inoculation de la bactérie à une plante est également caractérisée par l'absence d'une période de latence dans l'insecte (Purcell & Finlay, 1979).

2.7.1 Comportement alimentaire des vecteurs

L'alimentation des espèces d'Auchenorrhyncha se déroule en plusieurs étapes que l'on peut résumer en 4 phases (Pollard, 1968).

Une fois la plante hôte localisée, l'insecte explore la surface en touchant celle-ci avec la pointe du labium et en sécrétant des gouttes de salives (Sogawa, 1982).

Ensuite, l'insecte appuie fermement son labium sur la surface de la plante et y insère ses stylets à travers une goutte salivaire qui se gélifie, il continue à saliver pendant la pénétration des tissus ce qui forme une gaine salivaire autour des stylets. Les Auchenorrhyncha diffèrent des pucerons car ils sondent des tissus intracellulaires plutôt qu'intercellulaires (Pollard, 1968). Il existe deux types de sondages : ceux dans le tissu épidermique et d'autres exploratoires beaucoup plus profonds afin de localiser un meilleur tissu d'alimentation (Sogawa, 1982).

Lorsqu'un tissu approprié a été localisé, l'insecte commence à s'alimenter tout en sécrétant de la salive liquide pour digérer la sève (Nault & Rodriguez, 1985).

Enfin, l'insecte termine le sondage en rétractant ses stylets tout en continuant à saliver et laisse donc, dans le tissu, une gaine salivaire faisant apparaître en surface une marque d'alimentation (Miles, 1972).

2.7.2 Mécanisme d'expulsion-salivation

L'inoculation de *X.fastidiosa* peut-être expliquée par le mécanisme d'expulsion-salivation. Ce mécanisme consiste à expulser une colonne de fluide contenant les cellules bactériennes en suspension dans le cibarium et le precibarium en même temps que la salive lors de l'alimentation de l'insecte (Backus et al., 2009;2014).

En raison de l'absence de période de latence, il est possible que *X.fastidiosa* possède un mécanisme de transmission bimodal. La transmission non-persistante se produirait lorsque les cellules bactériennes ingérées par l'insecte resteraient durant un temps très court (secondes ou minutes) dans une colonne de fluide dans le lumen de l'intestin et seraient ensuite expulsées lors d'une alimentation sur une plante saine. Dans le cas du mécanisme de transmission persistante, le fluide contenant les cellules bactériennes ne serait pas expulsé de l'intestin rapidement et y resterait relativement longtemps (heures ou jours), les bactéries peuvent donc s'installer progressivement et adhérer à la paroi pour former un biofilm et coloniser le cibarium et precibarium de l'intestin (Backus et al., 2014) .

3 Identifications des vecteurs

Parce que la bactérie était uniquement présente depuis plus d'une centaine d'années sur le continent américain, les principaux insectes vecteurs connus ont été identifiés et étudiés dans cette zone biogéographique (Redak et al., 2004). Tous les vecteurs connus de la bactérie sont des Hémiptères qui appartiennent au sous-ordre des Auchenorrhyncha. Parmi l'infra-ordre des Cicadomorpha, les insectes des superfamilles des Cercopoidea, Cicadoidea et Membracoidea sont considérés comme des spécialistes xylémophages et se sont révélés vecteurs de *X.fastidiosa* (Redak et al., 2004). La sous-famille des Cicadellinae, qui inclut les plus importants vecteurs connus de *X.fastidiosa*, est très diversifiée. Elle contient approximativement 1950 espèces (Mejdalani, 1998) et représente 9% du nombre total d'espèces de la famille des Cicadellidae (Knight & Webb, 1993). Au total, 19 genres et 39 espèces de Cicadellinae ont été identifiés comme vecteurs de *X.fastidiosa* (Redak et al., 2004).

Les cercopes, les cicadelles et les cigales sont des insectes appartenant respectivement aux superfamilles des Cercopoidea, Cicadoidea et Cicadellinae. Ces hexapodes se développent suivant un stade œuf, cinq stades nymphaux et un stade adulte ailé. Les nymphes des cigales et des cercopes de la famille des Cercopidae se nourrissent de racines souterraines tandis que les nymphes des cercopes de la famille des Aphrophoridae et des nymphes de cicadelles se développent sur les parties aériennes des plantes. Néanmoins, leurs imagos se nourrissent et vivent tous sur la végétation visible (Ossiannilsson, 1981) (Redak et al., 2004).

3.1 Vecteurs non-européens de *X.fastidiosa*

La quasi totalité des vecteurs non-européens se retrouve sur le continent américain. La plupart de ces espèces vectrices américaines vivent dans des écosystèmes tropicaux et subtropicaux leur permettant de se développer et de se reproduire toute l'année. Cependant, les espèces nord américaines, telles que *Draeculacephala minerva* Ball., *Graphocephala atropunctata* Signoret., *Xyphon fulgida* Nottingham. et *Homalodisca vitripennis* Germar., peuvent passer l'hiver au stade adulte (University of California's Agricultural Experiment Station - Berkley, 2017).

Les cicadelles (famille des Cicadellidae, sous-famille des Cicadellinae) sont de loin les vecteurs les plus importants de *X.fastidiosa* sur le continent américain (Wilson et al., 2009). L'espèce vectrice la plus invasive sur le continent américain est *H.vitripennis* qui a été introduite accidentellement en Californie dans les années 1980 et a provoqué une épidémie sans précédent de la maladie de Pierce dans les vignes californiennes (Hopkins & Purcell, 2002). Les espèces vectrices les plus importantes sur le continent américain ainsi que leurs distributions géographiques, leurs plantes hôtes et leurs rôles de transmission sont présentées au Tableau 2.

Tableau 2 - Vecteurs de *X.fastidiosa* sur le continent américain: principaux groupes d'insectes et espèces vectrices les plus importantes (Redak et al., 2004)

Groupe d'insecte	Espèces les plus importantes	Distribution	Rôle du vecteur	Critères
Cicadelles (Cicadellidae, Cicadellinae): 38 espèces	<i>Bucephalagonia xanthopis</i> (Berg)	Argentine, Bolivie, Brésil, Paraguay	Important dans les agrumes	Commun, abondant sur les plantes ornementales, les agrumes et dans les pépinières
	<i>Dilobopterus costalimai</i> Young	Brésil	Important dans les agrumes	Commun, abondant sur les plantes ornementales, les agrumes
	<i>Graphocephala atropunctata</i> (Signoret)	Etats-Unis et Amérique centrale	Important dans les vignes	Commun dans divers écosystèmes, sur vignes et plantes ornementales
	<i>Homalodisca vitripennis</i> (Germar)	Etats-Unis (états du sud), Mexique (nord), Polynésie française et île de Pâques	Important dans les vignes	Commun et abondant dans divers écosystèmes, plantes ornementales, agrumes et pépinières
Cercopes (Cercopoidea) : 6 espèces	<i>Philaenus spumarius</i> L.	Etats-Unis, Mexique, Tahiti	Faible	Non associé à une épidémie de maladie
Cigales (Cicadoidea) : 2 espèces	<i>Diceroprocta apache</i> Davis	Mexique, Etats-Unis (Arizona, Utah, Nevada, Californie)	Incertain	Information manquante sur la capacité de transmission de <i>X.fastidiosa</i>
	<i>Dorisiana viridis</i> (Olivier)			

3.2 Vecteur européen de *X.fastidiosa*

En 2010, Janse & Obradovic (2010) avaient déjà identifié deux potentiels vecteurs en Europe : la cicadelle verte, *Cicadella viridis* L.(Hemiptère : Cicadelidae) ainsi que le cercope des prés *Philaenus spumarius* L. (Hemiptère : Aphrophoridae). En effet, plusieurs espèces du genre *Philaenus* ont été identifiées comme vecteurs aux Etats-Unis incluant l'espèce *P.spumarius* (Severin, 1950 ; Purcell, 1980).

Après la détection de la présence de *X.fastidiosa* sous-espèce *pauca* dans la région des Pouilles en 2013 (Saponari et al., 2013), seule l'espèce, *P.spumarius* a été identifiée comme responsable de la transmission de la bactérie présente dans la péninsule du Salento (Saponari et al., 2014). Il reste, à ce jour, le seul vecteur identifié en Europe.

3.2.1 Description générale

Le cercope des prés, *Philaenus spumarius* L. (Figure 6), est un insecte piqueur-suceur originaire d'Eurasie appartenant à la famille des Aphrophoridae (University of California's Agricultural Experiment Station - Berkley, 2017).

Ordre : *Hemiptera*

Sous-ordre: Auchenorrhyncha

Infra-ordre: Cicadomorpha

Super-famille: Cercopoidea

Famille: Aphrophoridae

Genre: *Philaenus*

Espèce : *P.spumarius*



Figure 6- *Philaenus spumarius* L., (Walwyn, 2008)

L'insecte mesure approximativement 6 millimètres de long, les femelles sont généralement un peu plus grandes que les mâles (Yurtsever, 2000). Il est extrêmement polyphage et se rencontre dans divers habitats tels que des champs abandonnés et cultivés, les bords de routes, les parcs et jardins et aussi les forêts (Stewart, Lees, & Lees, 1996). Il existe des centaines de plantes hôtes (arbres, plantes herbacées, buissons) à travers le monde sur lesquelles les larves et les adultes peuvent se développer, s'alimenter et se reproduire (Lavigne, 1959 ; Archibald et al., 1979 ; Davis & Mitchell, 1946). Le cercope des prés s'alimente principalement sur les plantes dicotylédones et rarement sur les monocotylédones (Weaver & King, 1954). Les adultes arborent un polymorphisme hors du commun. En effet, 16 phénotypes ont été recensés dans l'espèce (Yurtsever, 2000). C'est la raison pour laquelle, elle a longuement été étudiée pour des aspects génétiques et polymorphiques. Il existe très peu d'informations sur la biologie, le comportement et l'écologie de *P.spumarius* en Italie (Saponari et al., 2014).

3.2.2 Stades de développement

L'insecte est considéré comme une espèce univoltine bien que Drosopoulos & Asche (1991) pensent que l'espèce peut être bivoltine dans certaines parties de Grèce. L'oviposition débute fin de l'été, sur les tiges des plantes, lorsque la durée du jour diminue et que les températures baissent. Les femelles déposent jusqu'à 400 œufs en paquets de 10-20 œufs (Yurtsever, 2000). Les œufs passent l'hiver en diapause et éclosent le printemps suivant (Germain, 2016). Une fois l'œuf éclos, une somme de 670 degrés jours au dessus de 2,8°C conduit à l'émergence de 50% d'adultes (Chmiel & Wilson, 1979). Il y a 5 stades larvaires durant lesquels les larves produisent une sécrétion spumeuse, communément appelée "crachat de coucou" (Figure 7), afin de se développer et se protéger des prédateurs (Yurtsever, 2000). Les premiers adultes sont observés au plus tôt au mois d'avril en Europe du sud (Germain, 2016) et peuvent survivre jusqu'en décembre dans la région des Pouilles (Cornara, Saponari, et al., 2016).

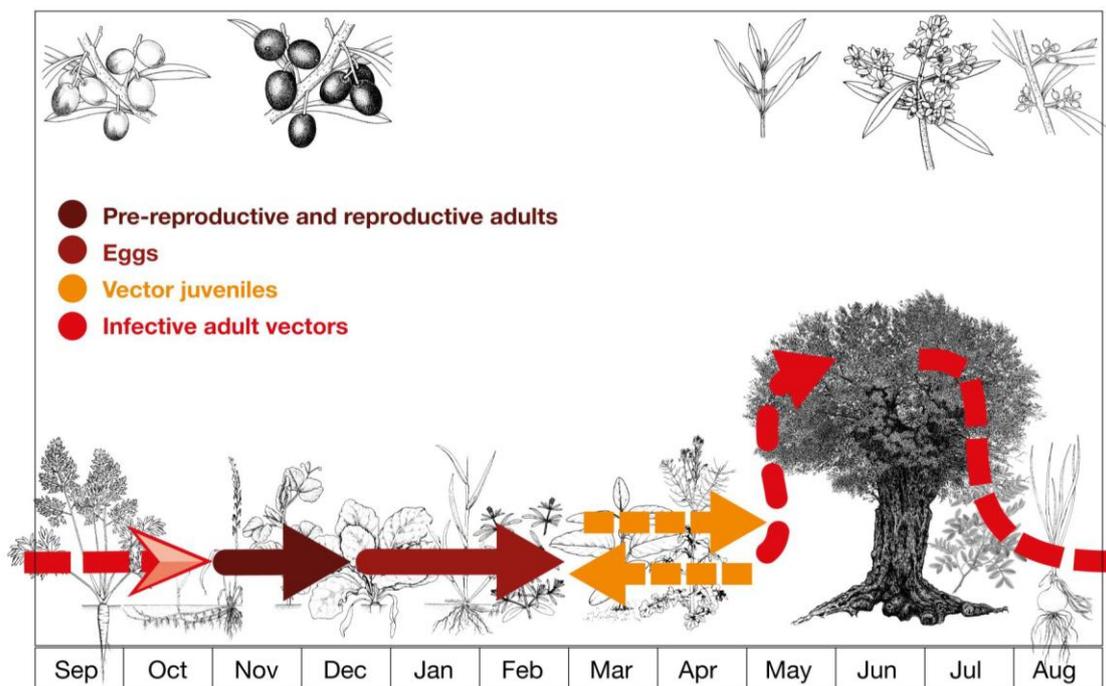


Figure 7. Amas spumeux sécrété par une larve de *P.spumarius* (Istrice, 2004)

3.2.3 Dynamique comportementale

Les cercopes des prés ne sont pas très actifs mais ils peuvent sauter ou voler lorsqu'ils sont dérangés (Germain, 2016). Alors que d'autres espèces de cercopes peuvent voler de 900 mètres jusqu'à 3 kilomètres (Nilakhe & Buainain, 1988), *P.spumarius* se disperse sur des distances bien plus courtes, de l'ordre de 100 mètres par jour. Avec une durée de vie de 4 à 6 mois, le cercope des prés pourrait donc se déplacer sur plusieurs kilomètres, particulièrement s'il est aidé par le vent (Weaver & King, 1954).

Dans l'agro-écosystème d'olivier du Salento, les nymphes des cercopes des prés se développent sur les végétaux de la strate herbacée au printemps. Lors de la période sèche qui s'étend généralement de mai à octobre, la strate herbacée est complètement desséchée, ce qui conduit les adultes à grimper dans la canopée des oliviers afin de s'alimenter. Lorsque les pluies permettent à la strate herbacée de reprendre, généralement en août, l'insecte y descend afin de pondre. L'acquisition de *X.fastidiosa* par l'insecte se fait donc pendant son alimentation dans la canopée des oliviers infectés ou bien en s'alimentant sur d'autres plantes hôtes infectées (Figure 8) (Cornara, Saponari, et al., 2016).



Version: 05 November 2015 22:25

Figure 8. Dynamique des cercopes dans l'agro-écosystème d'olivier dans la péninsule du Salento en Italie (Porcelli, 2015)

3.2.4 Dégâts directs

En Europe, cet insecte était rarement considéré comme un ravageur bien qu'il pouvait causer occasionnellement des dégâts aux fraisiers. Néanmoins, aux Etats-Unis, c'est un ravageur important de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) et des fraisiers (Zajac & Wilson, 1984). Les nymphes sont très voraces, elles peuvent consommer jusqu'à 280 fois l'équivalent de leur poids en sève en 24 heures (Horsfield, 1978). Elles provoquent des déformations et flétrissements de jeunes plantes et parfois une malformation des fleurs. L'adulte ne cause pas de dégâts directs (Germain, 2016).

3.2.5 Dégâts indirects

En production ornementale, il peut y avoir une dépréciation des plantes due à la présence d'amas spumeux secrétés par la larve (Germain, 2016).

En Europe, l'imago du cercope des prés infecté peut transmettre la bactérie *X.fastidiosa* à différentes plantes hôtes telles que l'olivier (*Olea europea* L.), l'oléandre (*Nerium oleander* L.), la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* L.) (Cariddi et al., 2014) et l'amandier (*Prunus dulcis* Mill.) (Saponari et al., 2013). La transmission aux oléandres est la plus efficace de toute, suivie de la pervenche de Madagascar et de l'olivier (Cornara, Cavalieri, et al., 2016) ce qui provoque les symptômes de dessèchement.

3.2.6 Répartition géographique

Philaenus spumarius est assez commun et répandu à travers le monde, il est présent en Europe, en Afrique du nord, en Asie, en Amérique du Nord et en Océanie (CABI, 2015). Dans la zone infectée en Italie, le cercope des prés est l'Hémiptère xylémophage le plus abondant dans les oliveraies de la province de Lecce (Ben Moussa et al., 2016).

3.3 Vecteurs européens potentiels de *X.fastidiosa*

Tous les insectes se nourrissant de sève xylémienne devraient être considérés comme vecteurs potentiels (Redak et al., 2004). A l'exception du cercope des prés, toutes les espèces vectrices américaines sont absentes d'Europe selon les bases de données de la faune européenne (De Jong, 2013).

Bien que les cicadelles soient les plus importants vecteurs de *X.fastidiosa* sur le continent américain, il existe très peu d'espèces en Europe (Wilson et al., 2009). Une espèce de cicadelle est assez répandue en Europe, il s'agit de *Cicadella viridis* L. mais uniquement dans des environnements humides (EFSA, 2015). En revanche, il existe un nombre relativement élevé d'espèces de cercopes en Europe mais ces potentiels vecteurs européens n'ont pas été assez étudiés jusqu'à présent (Lopes et al., 2014).

Les cigales qui se nourrissent également de sève brute sont aussi suspectées d'être de potentiels vecteurs en Europe. Même s'il n'existe que 2 publications qui rapportent leurs rôles de vecteur de la *X.fastidiosa* (Paiaõ et al., 2002 ; Krell et al., 2007), les experts de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) considèrent de manière pertinente le potentiel rôle des cigales comme vecteurs (EFSA, 2015).

Les espèces de vecteurs potentiels les plus importantes en Europe, leurs distributions, leurs niveaux de potentialité ainsi que des critères les appuyant sont présentés au Tableau 3.

3.3.1 Dans la péninsule du Salento

Cornara et ses collègues (2016) ont capturé 3 espèces de vecteurs potentiels et l'espèce vectrice connue à ce jour entre octobre 2013 et décembre 2014 aux alentours de Gallipoli. Il s'agissait de deux cercopes (*Neophilaenus campestris* (Fallèn) et *Cercopis sanguinolenta* (Scopoli)) et une cigale (*Cicada orni* (L.)). Ces potentiels vecteurs ont tous été testés négatifs à la *X.fastidiosa* excepté 1/200 *N.campestris*.

Tableau 3 - Présentation du vecteur actuel et des espèces de vecteurs potentiels les plus importantes en Europe (EFSA, 2015)

Groupe d'insecte	Espèce la plus commune	Distribution	Potentiel rôle de vecteur	Critères
Cicadelles (Cicadellidae, Cicadellinae): 7 espèces	<i>Cicadella viridis</i> (Linnaeus 1758)	Toute l'Europe	Modéré à élevé	Très commune, large gamme de plantes hôtes, mais hygrophile
Cercopes (Cercopoidea): 34 espèces	<i>Aphrophora alni</i> (Fallen 1805)	Toute l'Europe	Modéré à élevé	Commune, large gamme de plantes hôtes
	<i>Aphrophora salicina</i> (Goeze 1778)	Toute l'Europe	Modéré	Commune, Oligophage
	<i>Philaenus spumarius</i> (L.)	Toute l'Europe	élevé	Très commune et abondante dans divers écosystèmes. Identifiée comme vecteur dans les Pouilles (Saponari et al., 2014)
	<i>Cercopis vulnerata</i> Rossi 1807	Pas présente en Europe du nord	Modéré	Plusieurs plantes hôtes mais principalement des plantes herbacées
Cigales (Cicadoidea): 54 espèces	<i>Cicada orni</i> Linnaeus	Pas présente en Europe du nord	Douteux	Informations manquantes sur la capacité de transmission
	<i>Cicadatra atra</i> (Olivier)	Balkans, Italie et France	Douteux	Informations manquantes sur la capacité de transmission
	<i>Lyristes plebejus</i> (Scopoli)	Pas présente en Europe du nord	Douteux	Informations manquantes sur la capacité de transmission
	<i>Cicadivetta tibialis</i> (Panzer)	Pas présente en Europe du nord	Douteux	Informations manquantes sur la capacité de transmission
	<i>Tibicina haematodes</i> (Scopoli)	Pas présente en Europe du nord	Douteux	Informations manquantes sur la capacité de transmission

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ce travail de fin d'étude s'inscrit dans le cadre du projet italien "Ge.S.Oliv.". Ce projet multidisciplinaire est fondé sur la gestion durable et écologique de l'oléiculture afin de prévenir et contrôler l'infection de la *Xylella fastidiosa* dans le Salento et dans la zone limitrophe à risque de contamination. Cette recherche, pilotée par le Professeur Cristos Xyloyannis de l'Université de la Basilicate réunit de nombreux partenaires à savoir la Région des Pouilles, l'Université de Basilicate et sa Spin-off (Agreement), le Centre de Recherche National de Production Alimentaire de Lecce (CNR-ISPA), l'Université Aldo Moro de Bari et la confédération des producteurs agricoles (Copagri).

Bien que les recherches sur le vecteur de *X.fastidiosa* ont été majoritairement menées autour de Gallipoli qui est l'épicentre de l'épidémie dans la région des Pouilles, cette étude a été menée dans les environs de la ville de Lecce située à une quarantaine de kilomètres de l'épicentre. Afin d'enrichir les connaissances, en lien avec la bactérie, sur le vecteur (*Philaenus spumarius* L.) ainsi que sur les espèces appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha dont les vecteurs potentiels font partie et aussi d'étudier l'utilisation d'un nouvel insecte modèle (*Halyomorpha halys* (Stål)) pour comprendre son lien avec la bactérie, trois objectifs ont été proposés :

1. Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* en utilisant un nouveau modèle : *Halyomorpha halys* (Stål) ;
2. Etude de la dynamique de *Philaenus spumarius* L., *Neophilaenus campestris* (Fallén) ainsi que des insectes appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha dont les vecteurs potentiels font partie ;
3. Evaluation de la prévalence de *Philaenus spumarius* L. naturellement infecté par *X.fastidiosa*.

IV. MATERIEL ET METHODES

1 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* en utilisant un nouveau modèle, *Halyomorpha halys* (Stål)

1.1 Introduction

Dans un contexte d'échanges commerciaux internationaux de plus en plus fréquents, certains insectes sont amenés (accidentellement) sur des territoires où ils étaient absents. Certaines espèces invasives sont particulièrement dommageables pour l'économie et perturbent l'équilibre environnemental.

La punaise diabolique, *Halyomorpha halys*, est une espèce invasive de Pentatomidae originaire d'Asie qui a été introduite aux Etats-Unis et en Europe. Ce ravageur polyphage s'attaque à plus de 300 espèces de plantes cultivées et sauvages (Nielsen & Hamilton, 2009); (Hoebeke & Carter, 2003) dont l'olivier (*Olea europea* var.*Taggiasca*) dans le nord de l'Italie (Maistrello, Bariselli, & Mazzoli, 2013).

Sa présence a été signalée pour la première fois en 2012 dans le nord de l'Italie et colonise maintenant les régions d'Emilie-Romagne, du Piedmont, de la Lombardie, de Venise et du Frioul (Bariselli, Bugiani, & Maistrello, 2016). Il est opportun de penser que cette punaise arrivera dans la région des Pouilles, contaminée par la *X.fastidiosa*, en effet, Zhu et al.(2012) ont montré que cette punaise invasive pourrait bien coloniser l'Europe entière.

L'utilisation de ce nouveau modèle, qui n'est pas considéré comme vecteur potentiel de la *X.fastidiosa*, est une originalité afin de comprendre le lien entre la bactérie et la punaise diabolique.

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Test de survie aux diètes artificielles

Pour cette étude, 6 mâles adultes d'*Halyomorpha halys*, provenant de l'élevage de Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT), élevés sur plantes de fèves (*Vicia faba* L.) et graines de tournesols, ont été isolés dans une boîte avec aération (20x15x5cm) comprenant uniquement une boule de papier de 8 cm de diamètre imbibée d'eau de ville, afin de les faire jeûner. Les six punaises ont été affamées du 10/02/2017 au 13/02/2017 inclus dans le même local d'élevage à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une photopériode de 16 heures de luminosité.

Trois diètes artificielles ont été préparées. La première diète était à base de jus de carottes biologiques obtenu par extraction de carottes entières, la base de la deuxième diète était du jus de plantes de fève, enfin la troisième diète se composait d'eau sucrée à 15% de saccharose. La concentration en agarose de chacune des diètes était de 4,25gr/100ml afin de reproduire les caractéristiques physiques de l'alimentation naturelle de la punaise. Les trois mélanges différents ont été autoclavés pendant plus d'une heure afin de limiter ultérieurement le développement de champignons ou de bactéries (au cours de la stérilisation, les mélanges ont débordés bouchant l'autoclave). Vingt-cinq ml de la préparation autoclavée à base de jus de carottes biologiques ainsi que 25 ml de la préparation autoclavée à base d'eau sucrée ont ensuite été coulés séparément dans des boîtes de Pétri différentes (\varnothing 5 cm x H 1cm) jusqu'au ras du bord. 10 ml de diète autoclavée à base de jus de plantes de fève ont été coulés également jusqu'au ras du bord dans des boîtes de Pétri plus petites (\varnothing 3,5 cm x H 1cm) par manque de jus de plantes de fève. Les 3 diètes ont été recouvertes d'un film plastique alimentaire (cellophane) afin d'imiter la paroi de la nourriture naturelle et maintenir l'humidité de la diète en limitant son dessèchement.

Le 14/02/17, soit 5 jours après le début du jeûne, un individu mort durant le jeûne a été remplacé par un mâle non affamé. Les 6 insectes mâles ont été répartis par 2 individus dans 3 grandes boîtes de Pétri (\varnothing 13,6 cm x H 1,7 cm) recouvertes d'un filet tendu (1 mm de maille) et maintenu avec du ruban adhésif. Chacune des 3 diètes recouvertes de cellophane a été placée, coté cellophane sur le filet tendu, à l'extérieur de la cage car l'insecte préfère s'alimenter la tête en bas. Une boule de papier imbibée d'eau de ville a aussi été posée sur chaque filet pour abreuver les insectes. Les 3 boîtes contenant les 6 insectes ainsi que les diètes et boules de papier imbibées d'eau posées sur le filet ont été ensuite placées dans une plus grande cage afin de contenir les insectes s'ils parvenaient à s'échapper (Figure 9). Les boules de papier imbibées d'eau de ville ont été renouvelées quotidiennement. Le 17/02/17, les diètes artificielles ont été renouvelées. L'expérience a pris fin le 23/02/2017, soit un total de 10 jours sur diètes artificielles.



Figure 9 - Dispositif expérimental : test de survie d'*Halyomorpha halys* sur diète artificielle de jus de plantes de fève (Rossi, 2017)

1.2.2 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* à travers une diète artificielle

Cette expérimentation a été réalisée dans le laboratoire de quarantaine L2Q de l'unité de Phytopathologie intégrée et urbaine de GxABT. La sous-espèce de *Xylella fastidiosa* utilisée dans cette expérimentation était la *multiplex* qui a été cultivée et qui était disponible pour mes expérimentations.

De la même manière qu'au test de survie, 6 individus (3 mâles et 3 femelles) d'âge inconnu ont été affamés durant 5 jours.

Six diètes artificielles contenant la bactérie *Xylella fastidiosa* ont été préparées. Pour ce faire, deux béchers contenant chacun 15 ml de jus de plantes de fève ainsi que 1,33% d'agarose ont été chauffés jusqu'à dissolution de l'agarose, les solutions n'ont pas été stérilisées afin d'éviter le même incident survenu au test de survie. Ensuite, 3 ml d'une suspension cellulaire de 10^8 CFU/ml (DO 600 = 0,25) de *X.fastidiosa* ont été versés dans chacun des béchers préalablement refroidi à 38°C tout en continuant l'agitation magnétique de manière à homogénéiser la solution. Chaque solution contenue dans les béchers a été ensuite coulée rapidement à raison de ± 6 ml dans le couvercle d'une petite boîte de Pétri (\varnothing 3,5 cm x

H 1 cm) jusqu'au ras du bord. Les 6 diètes, refroidies à température ambiante, ont été recouvertes d'un film plastique alimentaire (cellophane).

Après la période de jeûne, les 6 individus ont été isolés individuellement dans 6 boîtes de Pétri (ø 9 cm - H 1,3 cm) recouvertes d'un filet (maille 1mm) tendu sur lequel est posée chacune des diètes artificielles contenant la bactérie. Par mesure de sécurité, les 6 boîtes de Pétri contenant les insectes et les diètes ont été placées dans une plus grande cage afin de contenir les insectes s'ils parvenaient à s'échapper (Figure 10). La période d'acquisition était de 24h. La température du laboratoire de quarantaine était de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et la photopériode était inconnue.

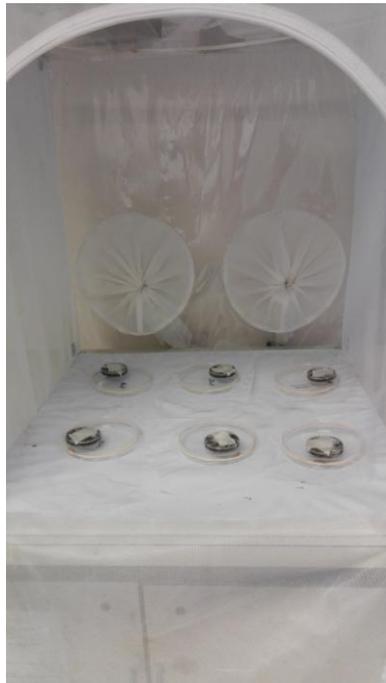


Figure 10 - Test préliminaire d'acquisition de *X.fastidiosa* par *Halyomorpha halys* (Rossi, 2017)

Après 24h d'acquisition, chaque couple (1 mâle et 1 femelle) a été placé dans une boîte de Pétri (ø 13,6 cm x H 1,7 cm) recouverte d'un filet (1mm de maille). Les diètes ont été retirées et remplacées par 3 morceaux de pommes bio placés à l'intérieur de chaque boîte de Pétri contenant les couples d'insectes (Figure 11). Trois périodes de rétention ont été proposées, à savoir 24h, 48h et 72h. Après chaque période de rétention, chaque individu d'un couple d'insecte (1 mâle et 1 femelle) a été prélevé et placé vivant dans un tube "Eppendorf" de 5 ml rempli d'éthanol 75%. A la fin de l'expérimentation, les 6 échantillons ont été placés à -80°C en vue d'une conservation de 4 mois.



Figure 11 - Période de rétention d'*Halyomorpha halys* avec des morceaux de pomme bio (Rossi, 2017)

1.2.3 Extraction ADN

Chacun des 6 individus a été disséqué dans un milieu d'eau stérile. Quatre parties ont été prélevées afin d'en extraire l'ADN ; les glandes salivaires, la tête (sans les yeux) comprenant les pièces buccales, l'hémolymph de l'abdomen pipeté au maximum et le reste du corps non utilisé.

Le protocole utilisé pour l'extraction d'ADN provient du séminaire "Current tools for the detection of *Xylella Fastidiosa* in host plants and vectors" (Annexe B). Quelques modifications ont été effectuées : 70 μ l de tampon CTAB ont été ajoutés avec l'échantillon dans le capuchon d'un tube de 1,5ml "Eppendorf" en vue de le broyer avec un pilon en plastique stérile. 430 μ l de tampon CTAB ont ensuite été ajoutés au tube et passé au vortex. L'incubation des échantillons a été réalisée à -20°C pendant 20 minutes. L'ADN a été suspendu dans une solution de 70 μ l d'eau distillée autoclavée et conservée à 4°C. La quantité d'ADN extrait et sa pureté ont ensuite été mesurées avec un NanoDrop en étalonnant avec de l'eau stérile.

1.2.4 Réactions et conditions de la PCR

Chaque mélange réactionnel (Tableau 4) contenait: 0,5 μ l d'ADN polymérase "Maxima Hot Start Taq" de la firme Thermo Scientific™, 1,8 μ l de MgCl₂ (25mM), 3 μ l de tampon Hot Start 10X, 0,6 μ l de primer RST-31 (20 μ M), 0,6 μ l de primer RST-33 (20 μ M), 3 μ l

de dNTPs (2mM), 100ng d'ADN, le reste étant de l'eau stérile autoclavée pour arriver à un volume final de 30µl.

Chaque réaction incluait un témoin positif d'ADN génomique de *X.fastidiosa* (10⁵ CFU/ml), un témoin positif d'ADN de *X.fastidiosa* retrouvée dans *P.spumarius* ainsi qu'un témoin négatif (eau stérile).

Le thermocycleur (IQ Cyclor, BioRad) a été programmé de la manière suivante (Tableau 5) : 15 min de préchauffage à 95°C pour l'activation de l'ADN polymérase Hot Start, 94°C pendant 5min pour l'étape de dénaturation, suivie par 35 cycles de 94°C pour 30sec, 55°C pour 30sec, 72°C pour 45sec; l'étape d'extension se déroulait à 72°C pendant 7 min. Les échantillons étaient ensuite conservés à 8°C en vue de les charger sur le gel d'électrophorèse.

Tableau 4 - Mélange réactionnel PCR *X.fastidiosa* (Bleve,2017)

Réactif	Volume
10X Hot Start PCR Buffer	3 µl
20 µM Primer RST-31	0,6 µl
20 µM Primer RST-33	0,6 µl
2 mM dNTPs	3 µl
25 mM Mg Cl 2	1,8 µl
Total ADN	100 ng
Maxima Hot Start Taq	0,5 µl
H2O stérile	volume restant
Total	30µl

Tableau 5 - Conditions PCR primers RST-31 et RST-33

Primers RST31/RST33	
94°C 5 min	1 cycle
94°C 30 sec	35 cycles
55°C 30 sec	
72°C 45 sec	
72°C 7 min	1 cycle

1.2.4.1 Gel d'électrophorèse

Chargement de 25-30µl de produits de PCR dans chaque puits d'un gel de 150 ml (1,2% d'agarose et TAE 1X avec 7,5µl de SYBR™ Safe DNA préalablement ajouté).

2 Etude de la dynamique de *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris* ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des *Auchenorrhyncha*

2.1 Introduction

Il existe actuellement peu d'études sur la dynamique comportementale du vecteur européen de *X.fastidiosa* dans la péninsule du Salento. Ces études se sont majoritairement concentrées autour de la ville de Gallipoli, épiceutre de l'épidémie. Comprendre et étudier précisément la dynamique de *P.spumarius* ainsi que des autres vecteurs potentiels est nécessaire pour adopter un plan de contrôle de ces insectes en vue de prévenir et contrôler l'expansion de la bactérie. La zone d'étude du projet "Ge.S.Oliv." était située dans deux localités distantes d'une quarantaine de kilomètres de l'épicentre, Gallipoli.

Dans le Salento, l'oléiculture est rarement fertilisée par manque de fonds des producteurs. De plus, la taille des arbres représente également un budget important pour l'exploitant. Toutes ces raisons font que les sols des oliveraies du Salento sont souvent carencés et la taille des arbres se fait tous les 4-5 ans. Une plante qui est carencée n'a pas un système immunitaire optimal pour lutter contre les pathogènes. En outre, une taille peu fréquente favorise l'arrivée d'agents pathogènes, due au manque de rayons lumineux et d'air circulant à l'intérieur de la canopée. De plus, un élagage trop peu fréquent réduit la productivité, augmente les besoins nutritionnels et la demande en eau des arbres mais favorise aussi les stress hydriques et physiologiques. En comblant rapidement les carences du sol, grâce au compost et à l'engrais minéral et en effectuant une taille drastique des oliviers, le projet "Ge.S.Oliv" entend bien restaurer le système immunitaire des oliviers et réduire l'arrivée de pathogènes supplémentaires afin de prévenir et de contrôler l'infection de la *X.fastidiosa*.

2.2 Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée du 30 mars au 30 juin 2017, dans deux oliveraies aux alentours de la ville de Lecce, dans la péninsule du Salento.

Les deux parcelles expérimentales sont situées respectivement dans la localité de Squinzano (40°27'9.65"N 18°3'4.84"E) et de Vernole (40°18'59.02"N 18°16'17.97"E). Afin de combler rapidement les carences retrouvées dans les sols de ces parcelles, 30 tonnes d'amendement compost ainsi que 60 unités d'azote minéral en deux fractionnement (30 unités + 30 unités) ont été apportées par parcelle expérimentale en février et mars 2017. Une taille des oliviers a été réalisée en avril 2017 afin de contrôler la charge bactérienne et laisser circuler air et lumière au centre de la canopée pour éviter le développement d'autres pathogènes.

La première parcelle expérimentale (Figure 12) est située dans la localité de Squinzano à environ 17 kilomètres au nord ouest de Lecce. Cette oliveraie est conduite en agriculture biologique. La surface expérimentale est d'environ 0,5 hectare (surface verte) comprenant 20 arbres, la surface témoin (surface jaune) comprend 12 arbres. Les oliviers, dont le cultivar est la Cellina di Nardò, sont âgés d'une cinquantaine d'années et ne sont pas irrigués. Il n'y a pas de travail du sol réalisé et l'enherbement est présent. Une taille sévère des arbres a été réalisée en avril 2017. Enfin, le niveau d'infection par la *X.fastidiosa* est considéré par "Ge.S.Oliv" comme moyen.

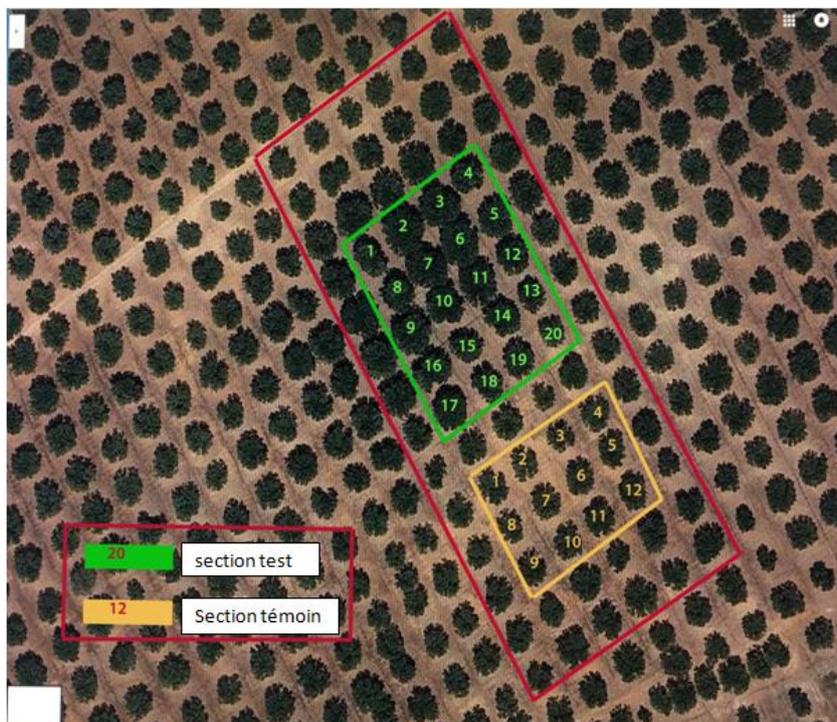


Figure 12 - Parcelle expérimentale de Squinzano (Ge.S.Oliv., 2017)

La seconde parcelle expérimentale (Figure 13) est située dans la localité de Vernole à environ 10 kilomètres au sud est de Lecce. Cette oliveraie est conduite en agriculture conventionnelle. La surface expérimentale est de environ 0,5 hectare (surface jaune) comprenant 22 arbres, la surface témoin (surface bleu) comprend 10 arbres . Les oliviers, dont le cultivar est la Cellina di Nardò, sont âgés d'une quatre-vingtaine d'années et ne sont pas irrigués. L'herbe a été tondu début mai. La taille des arbres a été réalisée en avril 2017. Enfin, le niveau d'infection par la *X.fastidiosa* est considéré par "Ge.S.Oliv" comme moyen.



Figure 13 - Parcelle expérimentale de Vernole (Ge.S.Oliv., 2017)

2.2.1 Cartographie des niveaux d'infection des oliviers

2.2.1.1 Méthode d'échantillonnage de la canopée utilisée dans le projet "Ge.s.Oliv"

La canopée de chaque arbre a été visuellement divisée en quatre quadrants qui correspondent aux quatre points cardinaux. Ensuite, 4 à 5 rameaux (avec des feuilles vertes) ont été prélevés à partir de chaque quadrant de manière à ce que chaque échantillon soit constitué de 16 à 20 rameaux. Au laboratoire, un total de 20 feuilles a été collecté sur les 16 à 20 rameaux de chaque échantillon. Le pétiole et la partie proximale de la nervure centrale ont été récupérés sur chaque feuille et ont été broyés au pilon dans un mortier avec de l'azote liquide afin d'obtenir une fine poudre. Cette poudre a ensuite été recueillie dans des tubes de 2ml, congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C pour l'extraction ultérieure de l'ADN

génomique. L'échantillonnage du champ de Vernole a été réalisé le 20/02/2017 et celui du champ de Squinzano a été réalisé le 24/02/2017.

2.2.1.2 Extraction ADN et PCR

L'ADN a été extrait de chaque échantillon avec le kit d'extraction "NucleoSpin Plant II" nécessitant quelques modifications : 70 à 100 mg d'échantillon ont été mélangés avec 600 µl de tampon LP1 et rebroyés à l'aide d'un pilon en plastique stérile. 12µl de RNase A ont été ajoutés, les échantillons ont été homogénéisés au vortex et incubés pendant 30 min à 65°C, ils ont ensuite été centrifugés (11000g) pendant 5 min. 700µl du surnageant ont été filtrés à travers une colonne "NucleoPlant", par centrifugation à 11000g pendant 2 min. Après avoir ajouté 560µl de tampon PC et homogénéisés au vortex, les échantillons ont été centrifugés pendant 1 min à 11000g dans une colonne de liaison d'ADN (700µl à la fois puisque c'est la capacité maximale de la colonne). Le liquide a été jeté et 400µl de tampon PW1 ont été ajoutés dans la colonne puis centrifugés 1 min à 11000g. Ensuite, 900µl de tampon PW2 ont été ajoutés et centrifugés 2 min à 11000g pour un séchage parfait de la colonne. La colonne a ensuite été transférée dans un nouveau tube, dans lequel elle a été éluée avec 50µl d'eau autoclavée pendant 10 min, avant une centrifugation de 1min et l'obtention de la solution d'ADN. La quantité d'ADN extrait et sa pureté ont ensuite été mesurées avec un NanoDrop en étalonnant avec de l'eau stérile.

Les échantillons ont été analysés avec une PCR quantitative et répartis selon plusieurs niveaux d'infection. Je n'ai malheureusement pas pu obtenir les résultats détaillés de ces analyses car ces données doivent encore être vérifiées par le CNR de Lecce. Néanmoins, la répartition du niveau d'infection sur les deux parcelles a pu m'être communiquée. Ces données appartiennent au projet "Ge.S.Oliv" et n'ont pas encore été publiées.

2.2.1.3 Schéma des niveaux d'infection des oliviers

Les schémas des niveaux d'infection des oliviers de Squinzano et Vernole sont représentés respectivement à la Figure 14 et à la Figure 15. Tous les oliviers sont distants de ± 13 mètres.

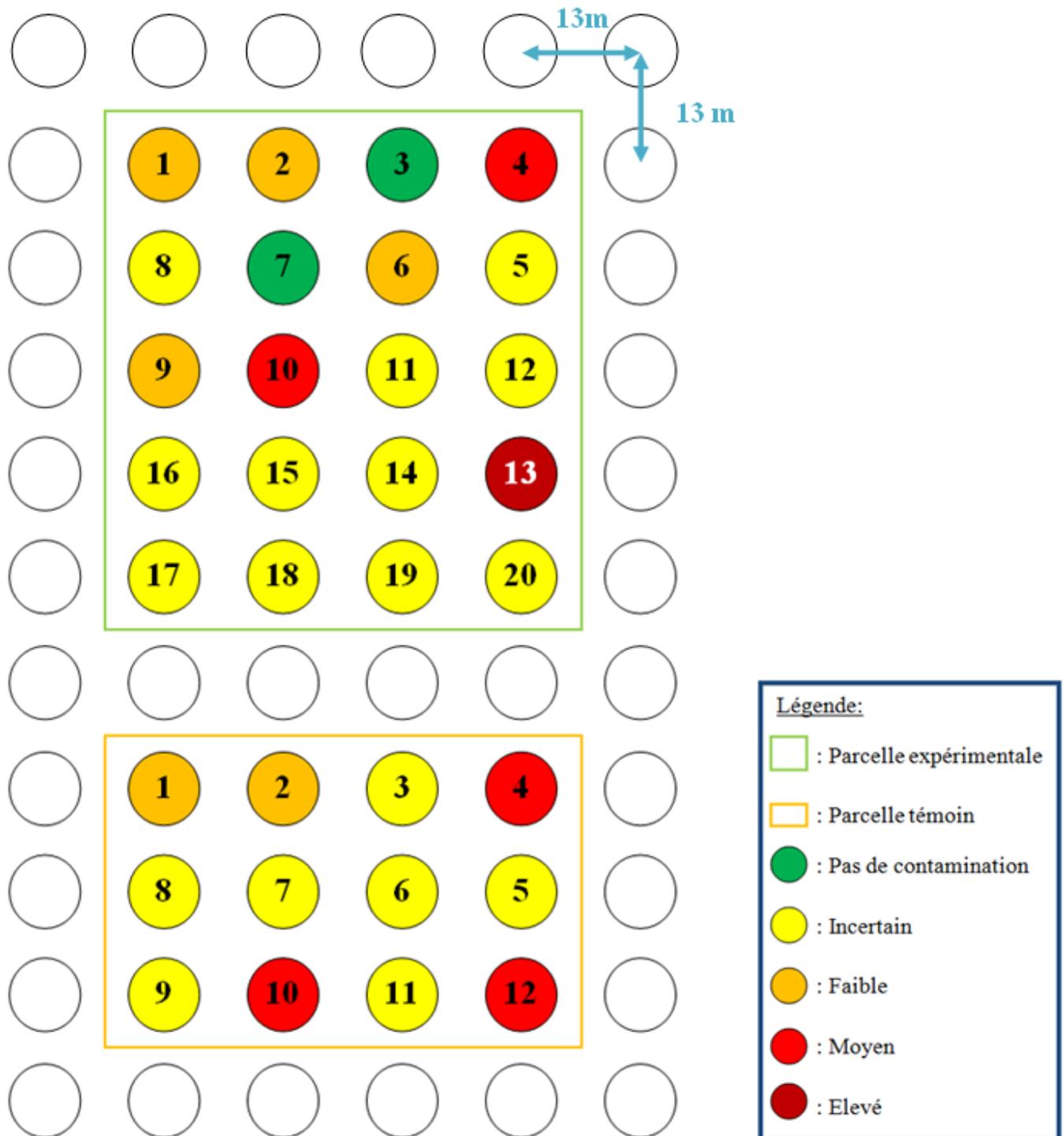


Figure 14 - Schéma du niveau d'infection des oliviers de Squinzano (Rossi, 2017)

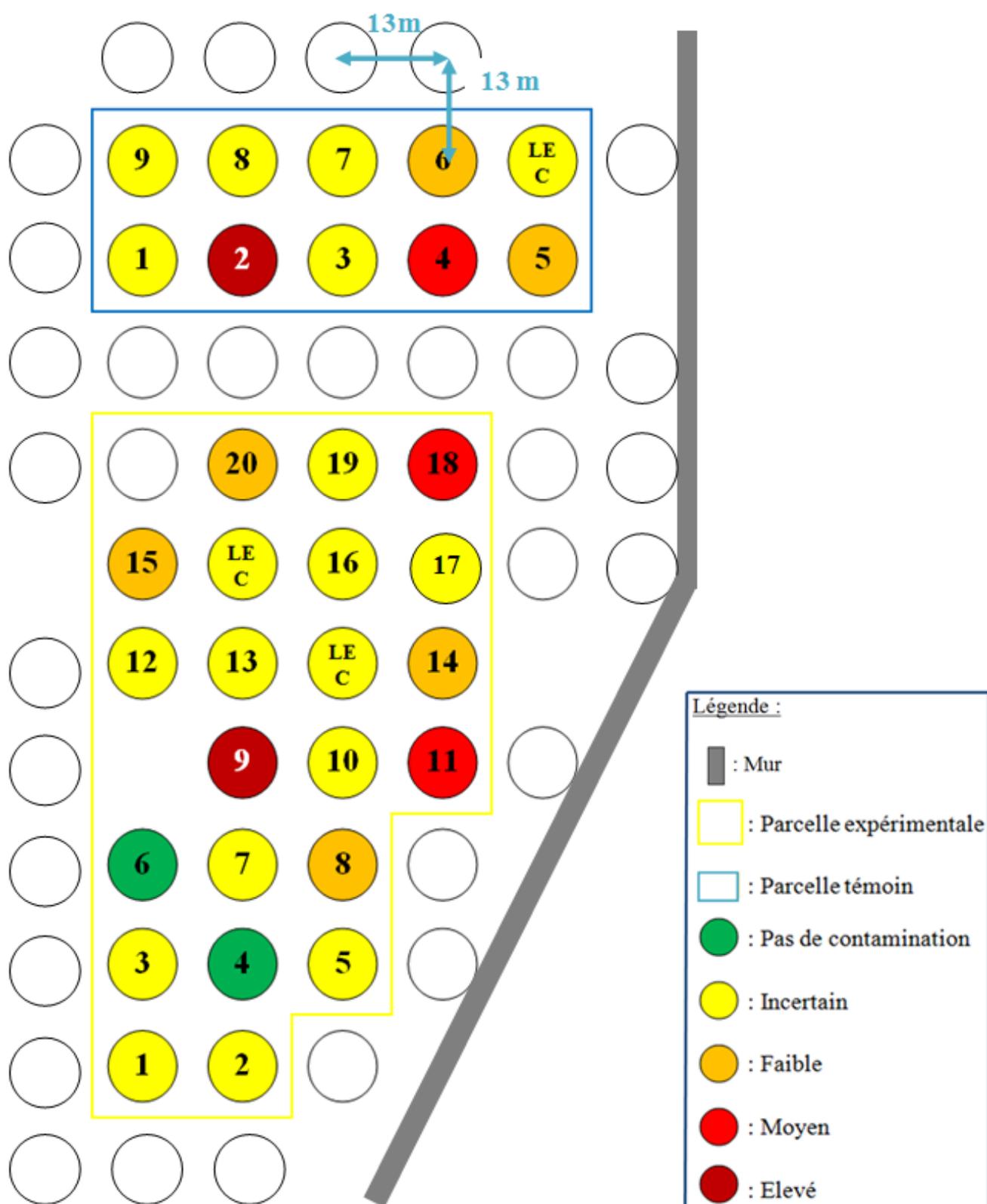


Figure 15 - Schéma du niveau d'infection des oliviers de Vernole (Rossi, 2017)

2.2.2 Evaluation de l'abondance de *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris* et des insectes du sous-ordre des Auchenorrhyncha (dont les vecteurs potentiels font partie) dans les deux oliveraies expérimentales

Du 27 avril au 23 juin 2017, chaque semaine au matin, les insectes appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha ont été collectés dans la strate herbacée avec un filet fauchoir circulaire (38 cm de diamètre). Chaque échantillon correspondait à 10 coups de filet. Des pièges collants jaunes (15 cm x 20cm, doubles faces collantes) ont été placés, à 2,5 mètres de hauteur, aux quatre points cardinaux ainsi qu'au centre de la canopée d'arbres infectés. Ces pièges étaient renouvelés tous les 15 jours.

Du 20 mai au 23 juin 2017, chaque semaine au matin, les canopées des oliviers infectés et non infectés ont été échantillonnées entre 2 et 4 mètres de hauteur aux quatre points cardinaux à l'aide d'un filet fauchoir (38cm de diamètre, 1,9 m de long). Tout le contenu d'un échantillon (10 coups de filet consécutifs) ainsi que les insectes collés sur chaque piège jaune étaient placés dans des sachets plastiques à fermeture hermétique. Ces sachets étaient stockés au congélateur afin de tuer les insectes encore vivants. Les insectes étaient premièrement stockés dans l'éthanol 75% et transportés au laboratoire pour l'identification et ensuite ils ont été placés dans de l'éthanol 99% en vue d'extraire l'ADN.

Les caractéristiques des deux champs étant différentes, deux protocoles d'échantillonnage différents ont été réalisés. L'échantillonnage de l'oliveraie de Squinzano se déroulait de 7h30 à 10h00 et de 10h30 à 13h pour l'oliveraie de Vernole.

2.2.2.1 Parcelle expérimentale de Vernole

2.2.2.1.1 Échantillonnage de la strate herbacée

Un échantillon dans la strate herbacée autour du tronc de chaque arbre infecté (9,11 et 18) et non infecté (4 et 6) a été collecté chaque semaine (soit 5 échantillons par semaine) (Figure 16Figure 16). De même, 5 autres échantillons ont été aléatoirement collectés hebdomadairement le long du mur de pierre.



Figure 16 - Végétation autour des troncs d'olivier à Vernole (Rossi, 2017)

2.2.2.1.2 Échantillonnage de la canopée

Cinq pièges collants jaunes ont été placés à 2,5 mètres d'hauteur aux quatre points cardinaux et au centre de la canopée des arbres infectés (9,11 et 18).

Un échantillon par arbre infecté (9,11, 18 et 2, 4 de la parcelle témoin) et non infecté (4 et 6) a été collecté depuis les quatre points cardinaux de la canopée.

2.2.2.2 Parcelle expérimentale de Squinzano

2.2.2.2.1 Échantillonnage de la strate herbacée

Quinze échantillons ont été collectés, chaque semaine, aléatoirement dans la strate herbacée des inter-rangs des oliviers. La strate herbacée n'a plus été échantillonnée à partir du 09 juin 2017 puisque l'agriculteur a tondu toute l'herbe de la parcelle expérimentale.

2.2.2.2.2 Échantillonnage de la canopée

Cinq pièges jaunes collants ont été placés à 2,5 mètres d'hauteur aux quatre points cardinaux et au centre de la canopée d'arbres infectés (4,10 et 13).

Un échantillon par arbre infecté (4,10 et 13) et non infecté (3 et 7) a été collecté depuis les quatre points cardinaux de la canopée. De la même manière, les canopées de cinq arbres,

non taillés et situés à maximum 200 mètres en dehors de la parcelle expérimentale ont été échantillonnées aléatoirement.

2.2.3 Identification des insectes

Les insectes récoltés ont été triés et identifiés suivant (Ossiannilsson, 1981) jusqu'au sous-ordre pour les Auchenorrhyncha et jusqu'à l'espèce pour *Philaenus spumarius* et *Neophilaenus campestris*.

3 Evaluation de la prévalence de *Philaenus spumarius* naturellement infecté par *X.fastidiosa*

3.1 Introduction

Le cercope des prés, *P.spumarius*, est le seul vecteur connu de la bactérie *X.fastidiosa* dans la péninsule du Salento. Cet insecte est responsable de l'expansion de la bactérie en Italie. Il est donc nécessaire d'évaluer la proportion d'insectes infectés au cours du temps pour mesurer le niveau d'expansion probable de la bactérie ainsi que de proposer un plan de gestion des vecteurs dans les oliveraies.

3.2 Matériel et méthodes

L'extraction d'ADN des cercoques des prés a été réalisée au Centre de Recherche National de Production Alimentaire de Lecce (CNR-ISPA). Les PCR ont été réalisées en partie au CNR-ISPA de Lecce et au laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive de GxABT.

3.2.1 Extraction ADN et PCR

Chaque tête de cercope des prés adulte a été séparée de son corps et chaque œil a été enlevé. Le protocole d'extraction ADN utilisé est identique à celui expliqué au §1.2.3. Quarante-sept échantillons ont été analysés au CNR de Lecce (Italie) suivant la réaction PCR modifiée suivante: chaque mélange réactionnel contenait 0,3 µl d'ADN polymérase "Maxima Hot Start Taq" de la firme Thermo Scientific™, 1,8µl de MgCl₂ (25mM), 3µl de tampon Hot Start 10X, 0,3µl de primer RST-31 (20µM), 0,3µl de primer RST-33 (20µM), 3µl de dNTPs (2mM), 100ng d'ADN, le reste étant de l'eau stérile autoclavée pour arriver à un volume final de 30µl. La condition de la PCR a été réalisée sans préchauffage de l'ADN polymérase Hot Start.

Les autres échantillons ont été analysés au CNR de Lecce et à GxABT en doublant les quantités de primers et en augmentant la quantité d'ADN polymérase suivant la réaction et la condition de la PCR identique au §1.2.4.

1 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* en utilisant un nouveau modèle : *Halyomorpha halys* (Stål)

1.1 Test de survie aux diètes artificielles

Un individu est mort sur la diète artificielle à base de jus de plantes de fève 4 jours après la mise en place des diètes artificielles.

Au bout de 10 jours d'expériences, les cinq autres insectes ont tous survécu sur leurs diètes artificielles respectives.

1.2 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* à travers une diète artificielle

Les résultats des PCR pour la détection de *X.fastidiosa* dans *H.halys* sont assez éloquentes. Les 24 échantillons (4 parties pour chacune des 6 punaises) testés se sont tous révélés négatifs à la présence de la bactérie *X.fastidiosa*.

2 Etude de la dynamique de *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris* ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des *Auchenorrhyncha*

Le premier jour d'échantillonnage correspondait à une phase de test du protocole, c'est pourquoi les données collectées le 27/04/2017 ont été supprimées. Le 5/05/2017 est donc considéré comme première date d'échantillonnage. Les 8 dates de captures correspondent donc successivement au 5 mai, 12 mai, 20 mai, 26 mai, 2 juin, 9 juin, 15 juin et 23 juin 2017.

Sur les 120 pièges jaunes utilisés au cours de l'étude, seulement deux *P.spumarius* ont été capturés. Les autres insectes piégés n'ont pas été identifiés.

Les données brutes sont présentés en ANNEXE C.

2.1 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme Minitab 18. Le modèle général linéaire a été utilisé afin d'analyser la variance entre les facteurs. Lorsque la P-valeur

est supérieur à 0,05, il y a égalité des moyennes et donc pas de différence significative. A l'inverse, si la P-valeur est inférieure à 0,05, alors une structuration des moyennes a été réalisée grâce au test de comparaison des moyennes de Tukey.

2.2 Parcelle expérimentale de Vernole

Il n'y a pas d'interaction entre les facteurs espèces et localisation de la capture ($P=0,448$) ni entre les facteurs dates et espèces ($P=0,099$). On peut donc interpréter chaque facteur indépendamment. Il n'y a pas de différence significative pour la localisation de la capture ($P=0,209$) ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence entre les trois localisations de capture (strate herbacée, canopées infectées et canopées saines) pour une espèce donnée. De plus, le facteur espèce ($P\leq 0,001$) a une différence très hautement significative, on observe donc, après structuration des moyennes, que les autres Auchenorrhyncha sont significativement différents de *N.campestris* et *P.spumarius* et que ces deux derniers ne sont pas significativement différents entre eux pour une localisation de capture donnée.

2.2.1 Abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers

L'abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers est présentée à la Figure 17.

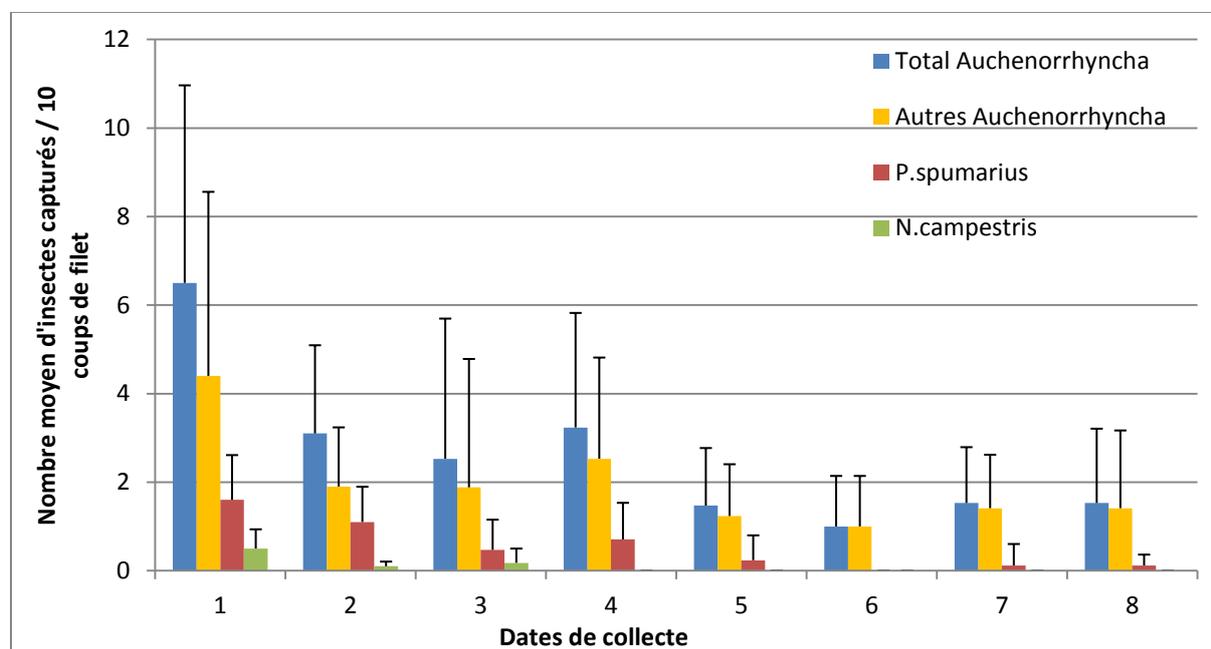


Figure 17 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée et dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole

Les espèces *P.spumarius* et *N.campestris* ne sont pas statistiquement différentes au contraire des autres Auchenorrhyncha capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers. Cependant, l'espèce *P.spumarius* semble être plus abondante que *N.campestris* qui n'est d'ailleurs plus retrouvée à partir du 26/05/2017. De plus, le nombre moyen d'autres insectes capturés appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha tend à diminuer dans l'agro-écosystème d'oliviers de Vernole au cours de l'étude et la même tendance est observée pour *P.spumarius* et *N.campestris*.

2.2.2 Abondance relative des insectes capturés dans la strate herbacée

Bien que la population des autres Auchenorrhyncha est statistiquement différente de celle de *P.sumarius* et de *N.campestris* dans la strate herbacée, on observe, à la Figure 18, la même tendance d'une diminution de ces insectes au cours du temps. L'espèce *N.campestris* semble être moins abondante que *P.spumarius* puisqu'elle n'est même plus retrouvée à partir du 26/05/2017.

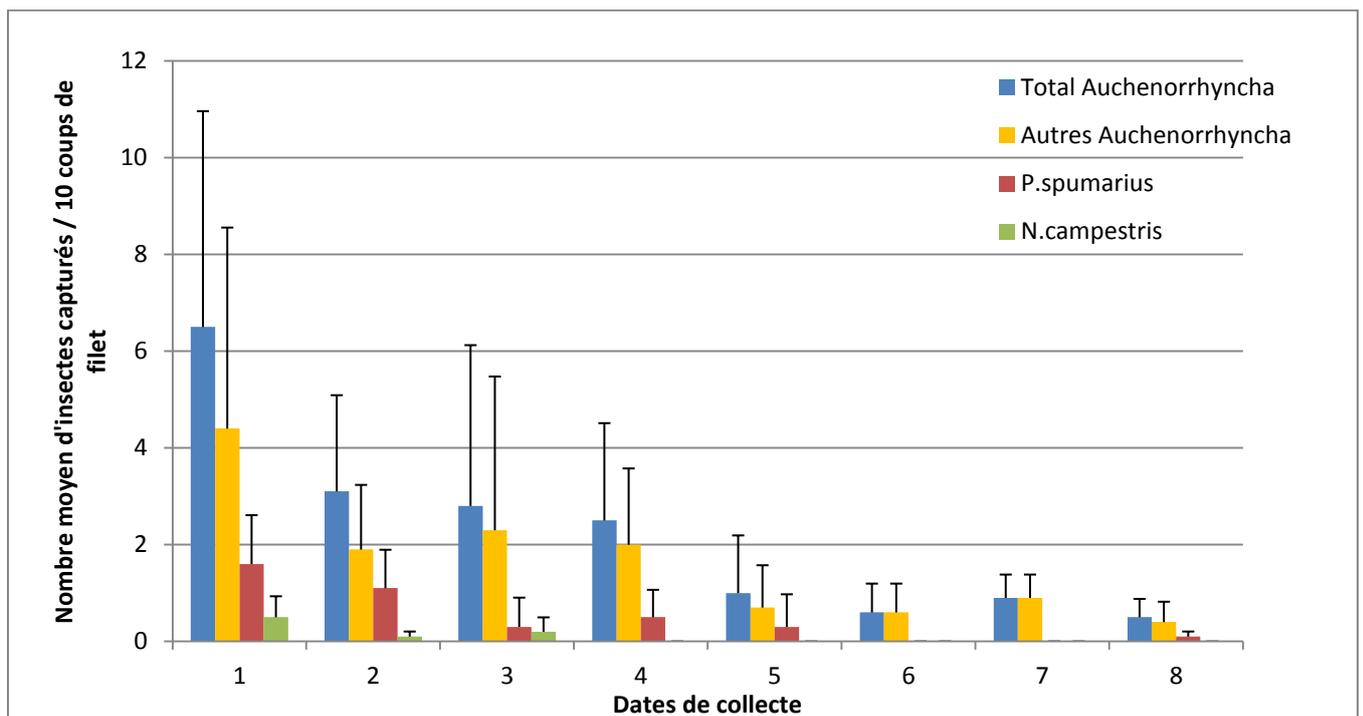


Figure 18 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée du champ expérimental de Vernole

2.2.3 Abondance relative des insectes capturés dans les canopées

L'abondance relative des insectes capturés dans les canopées est présentée à la Figure 19.

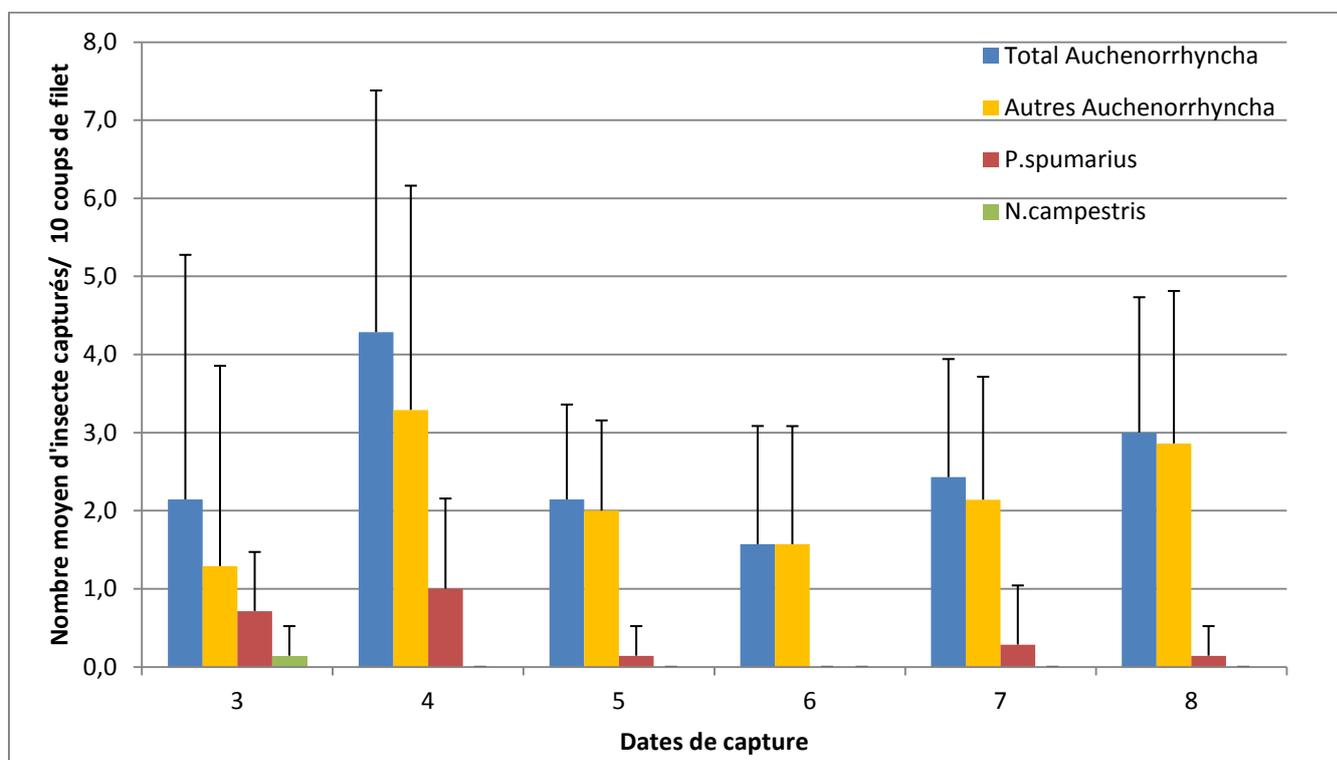


Figure 19 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole

L'analyse est la même pour cette localisation de capture. Les autres Auchenorrhyncha tendent vers une augmentation progressive de leur population tandis que *P.spumarius* semble décroître dans les canopées.

L'abondance relative des insectes capturés dans les canopées infectées et saines est présentée à la Figure 20.

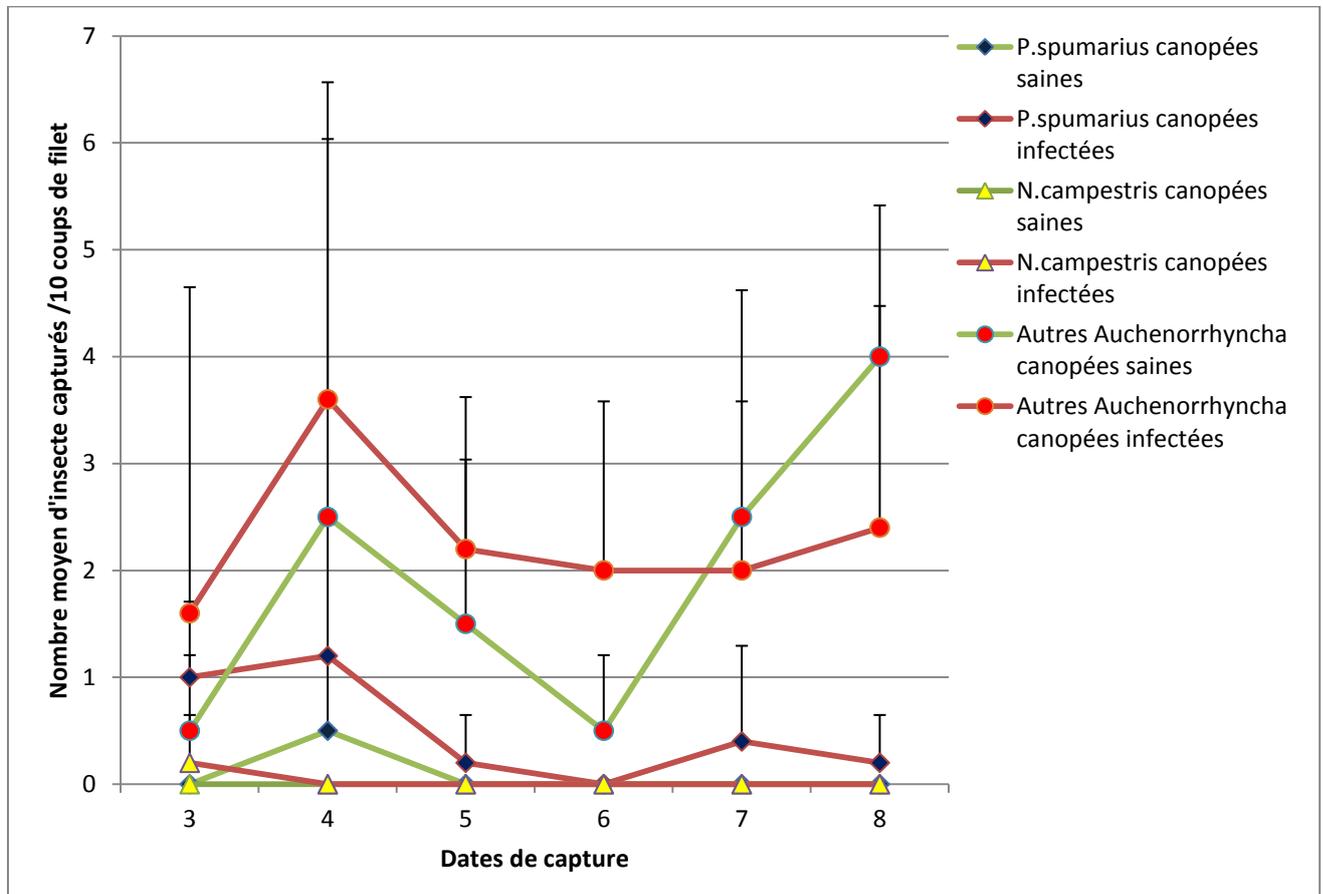


Figure 20 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans les canopées infectées et saines des oliviers du champ expérimental de Vernole

Il n'y a pas de différence significative entre les autres Auchenorrhyncha capturés dans les canopées saines et infectées. Il en est de même pour *P.spumarius* et *N.campestris*. Il semble que la population de *P.spumarius* et *N.campestris* diminue dans les deux types de canopée alors qu'elle augmente pour les autres Auchenorrhyncha.

2.2.4 Abondance de *P.spumarius* dans l'oliveraie

La Figure 21 représente l'évolution du nombre moyen de cercopes des prés collectés hebdomadairement dans la strate herbacée et dans les canopées des oliviers de Vernole.

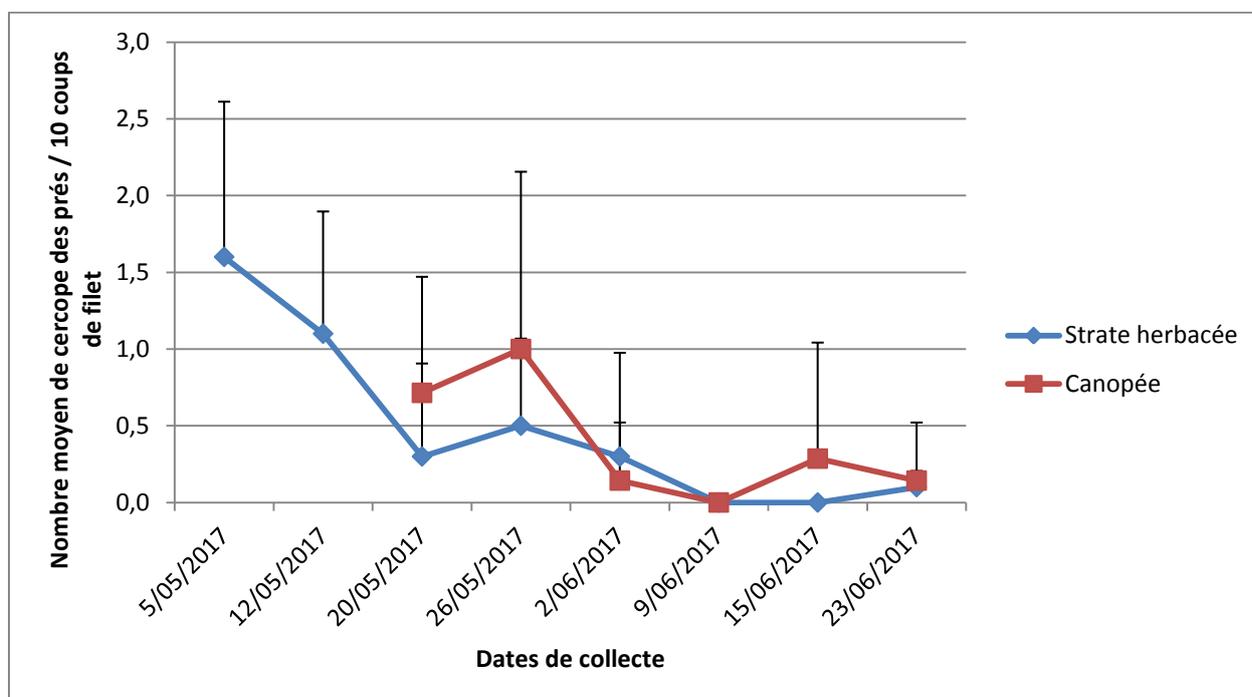


Figure 21 - Evolution du nombre moyen de cercopes des prés (*P.spumarius*) collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée et dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole

Il n'y a pas de différence significative des captures de *P.spumarius* dans l'herbe et dans les canopées. Néanmoins, le nombre de cercopes des prés semble être plus important dans la canopée à l'exception du 02/06/2017.

2.3 Parcelle expérimentale de Squinzano

Il y a des interactions significatives entre les facteurs espèces et localisation de la capture ($P \leq 0,001$) ainsi qu'entre les facteurs dates et espèces ($P \leq 0,001$).

2.3.1 Abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers

L'abondance relative des insectes capturés dans l'agro-écosystème d'oliviers est présentée à la Figure 22.

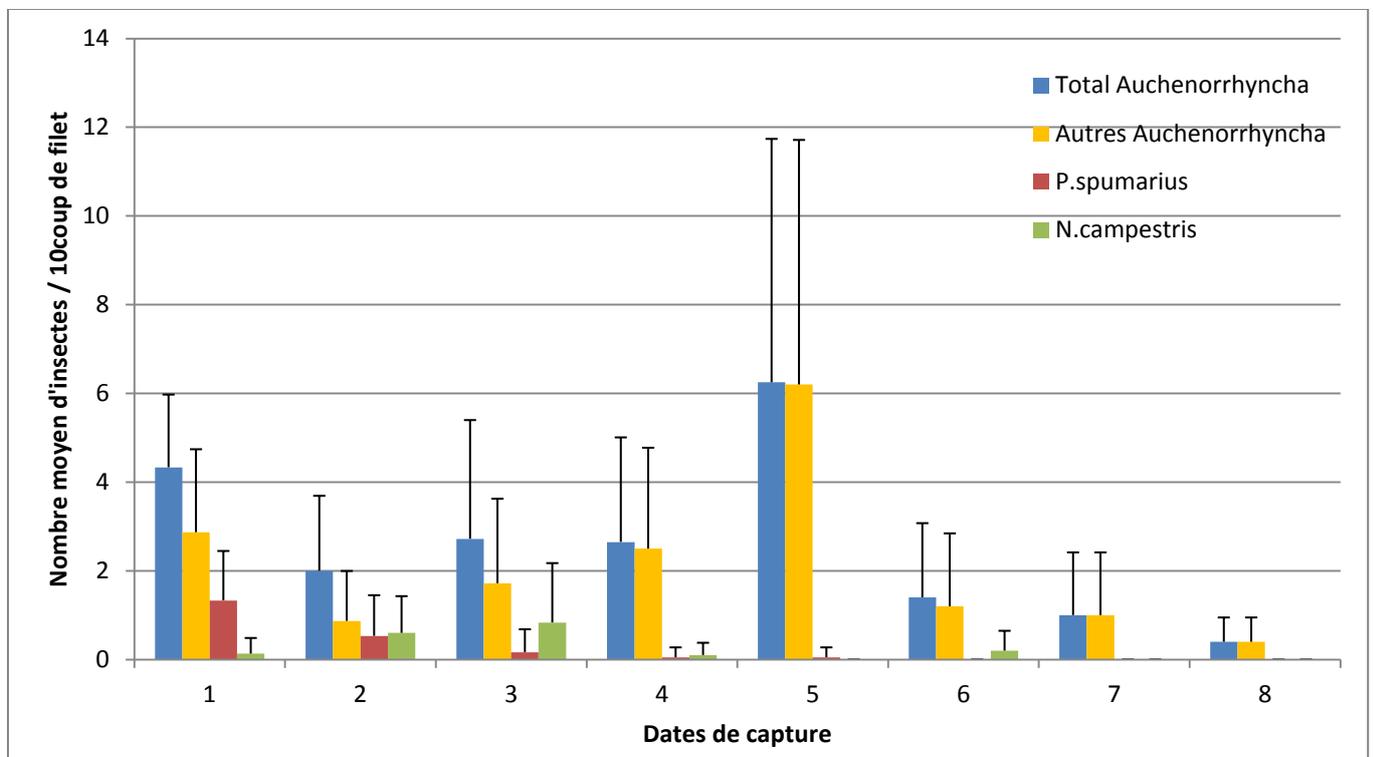


Figure 22 - Evolution du nombre moyen d'insectes capturés hebdomadairement par 10 coups de filet dans l'agro-écosystème d'olivier de Squinzano.

Les espèces *P.spumarius* et *N.campestris* ne sont pas significativement différentes au contraire des autres Auchenorrhyncha capturés uniquement dans la strate herbacée.

Le nombre moyen de *P.spumarius* tend à diminuer au cours du temps et il n'est plus observé à partir du 9/06/2017. La tendance générale des autres Auchenorrhyncha est également une diminution de la population au cours du temps. Cependant, un pic remarquable de la population des autres Auchenorrhyncha est toutefois observable le 02/06/2017.

2.3.2 Abondance relative des insectes capturés dans la strate herbacée

Les autres Auchenorrhyncha sont significativement différents de *P.spumarius* et *N.campestris* retrouvés dans la strate herbacée ($P=0,020$).

Cependant, on observe, à la Figure 23, une diminution globale des populations de *P.spumarius* et de *N.campestris* dans le même temps. La population des autres Auchenorrhyncha semble également diminuer au cours de l'étude à l'exception du 02 juin 2017.

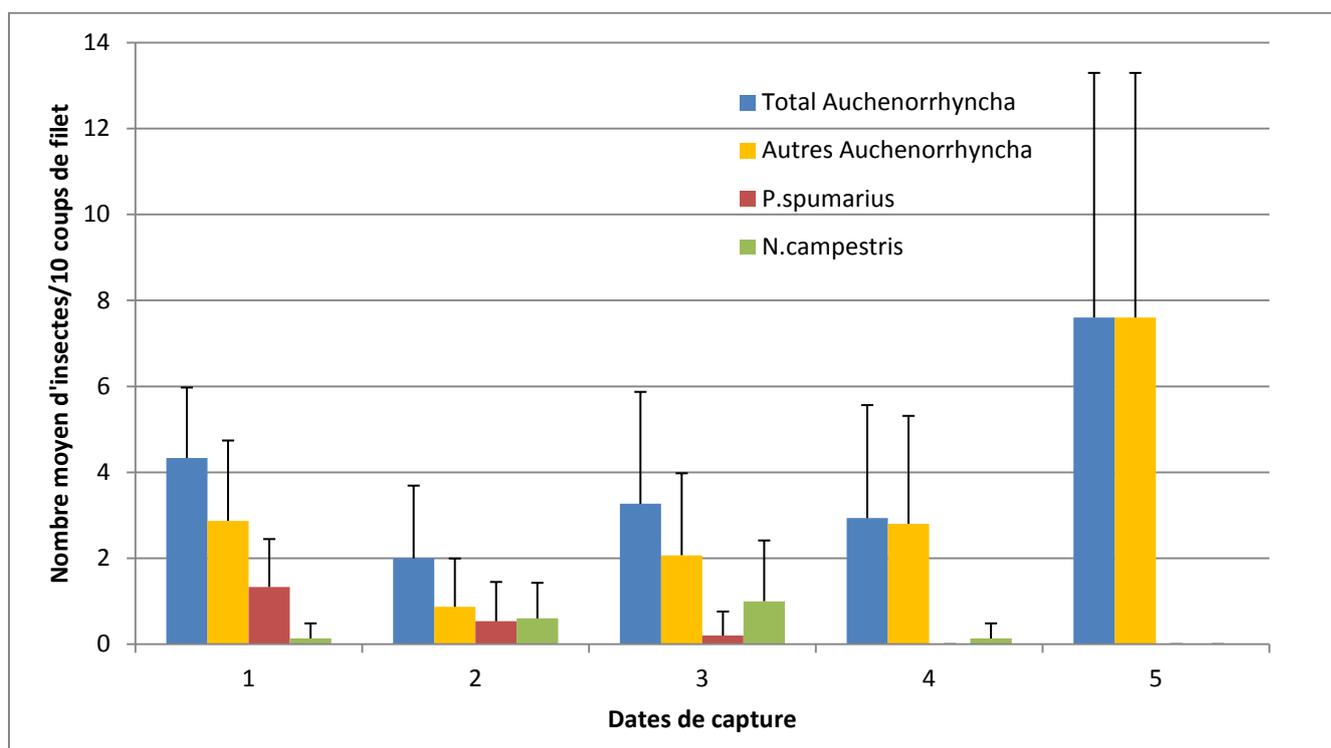


Figure 23 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée du champ expérimental de Squinzano.

2.3.3 Abondance relative des insectes capturés dans les canopées

2.3.3.1 Canopées des arbres de la parcelle expérimentale

L'abondance relative des insectes capturés dans les canopées est présentée à la Figure 24.

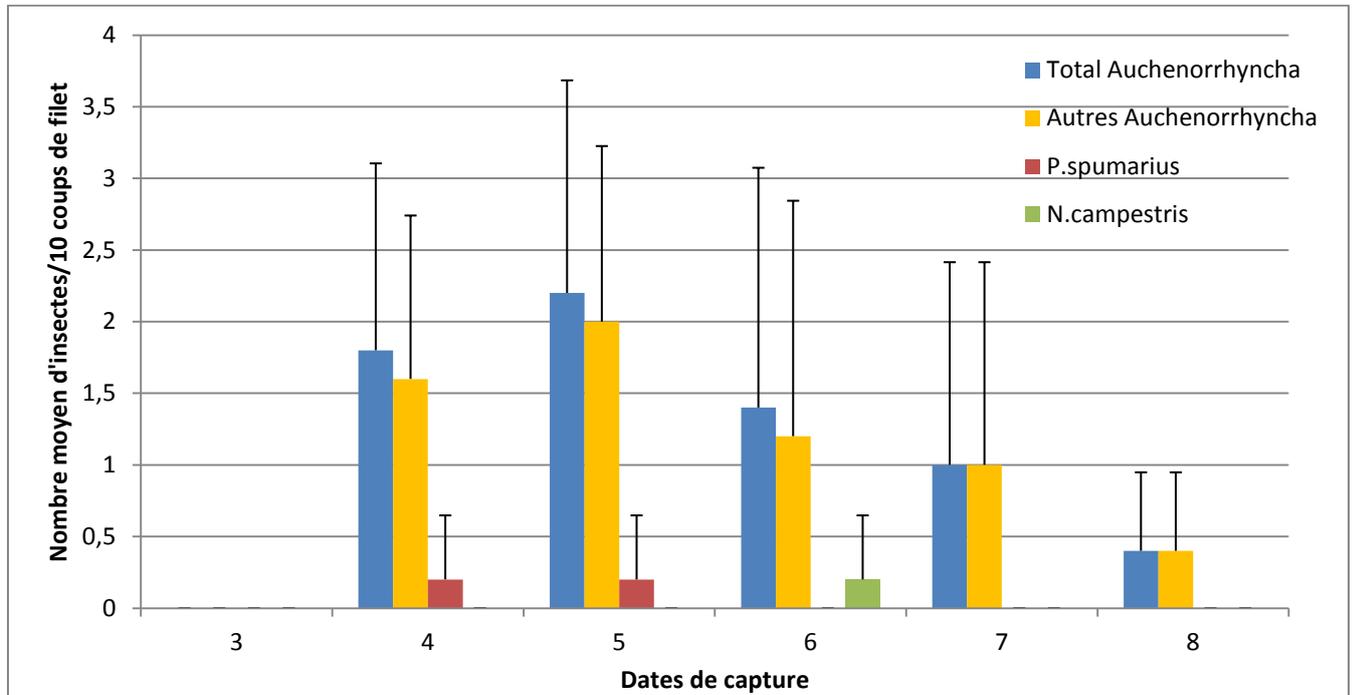


Figure 24 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la canopée des oliviers du champ expérimental de Squinzano.

Aucun insecte n'a été capturé la troisième semaine d'étude dans les canopées du champ expérimental. On remarque une tendance à la diminution des populations des autres Auchenorrhyncha.

Alors que seulement deux *P.spumarius* et un seul *N.campestris* ont été capturés dans les canopées des arbres de la parcelle expérimentale au cours de l'étude, il n'y a pas de différence significative entre les autres Auchenorrhyncha capturés, *P.spumarius* et *N.campestris* dans les canopées saines et infectées.

2.3.3.2 Canopées des arbres hors de la parcelle expérimentale

Une tendance d'augmentation de la population totale d'Auchenorrhyncha capturée au cours du temps est observée (Figure 25). La population de *P.spumarius* semble augmenter au cours de l'étude et elle semble être l'espèce la plus abondante d'Auchenorrhyncha retrouvée jusqu'au 15/06/2017.

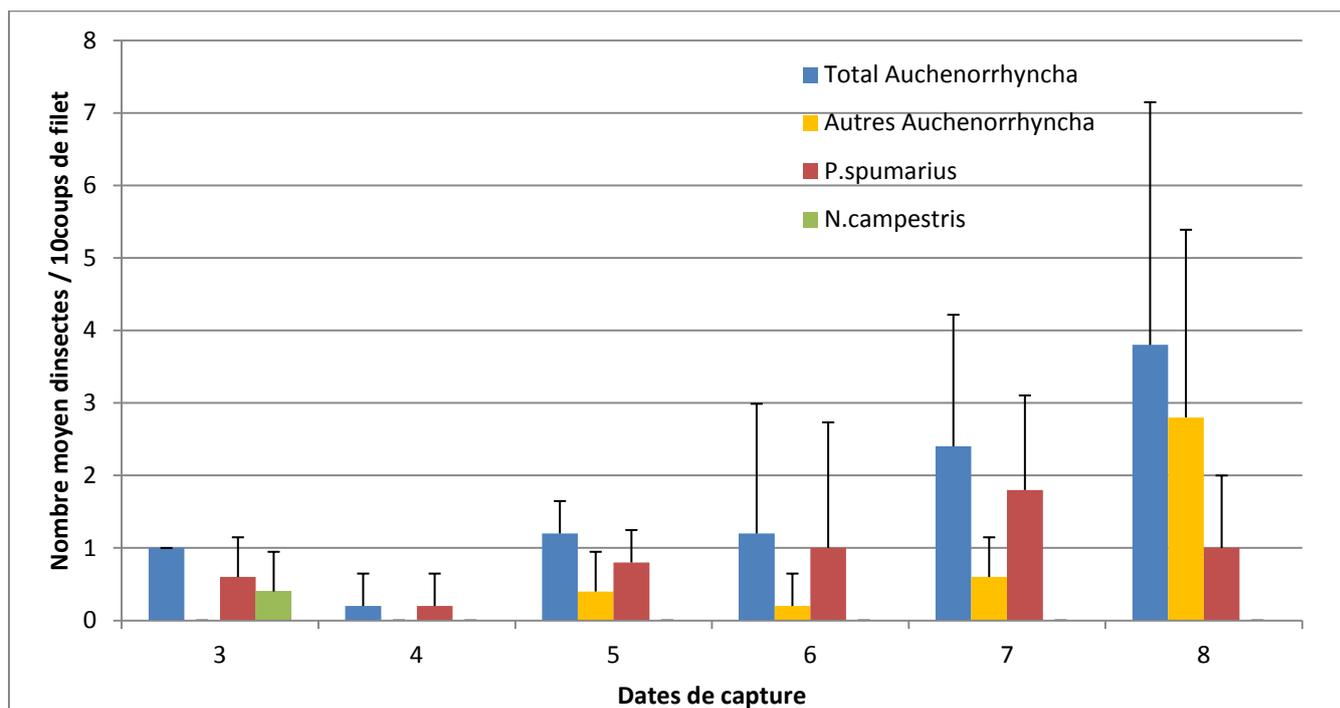


Figure 25 - Evolution du nombre moyen d'insectes collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la canopée des oliviers hors du champ expérimental de Squinzano.

Il n'y a pas de différence significative entre les espèces retrouvées dans les canopées hors de la parcelle expérimentale ($P=0,104$).

2.3.4 Abondance de *P.spumarius* dans l'oliveraie

L'évolution du nombre moyen de cercopes des prés collectés hebdomadairement dans la strate herbacée, dans les canopées des oliviers du champ expérimental et hors du champ expérimental de Squinzano est présentée (Figure 26).

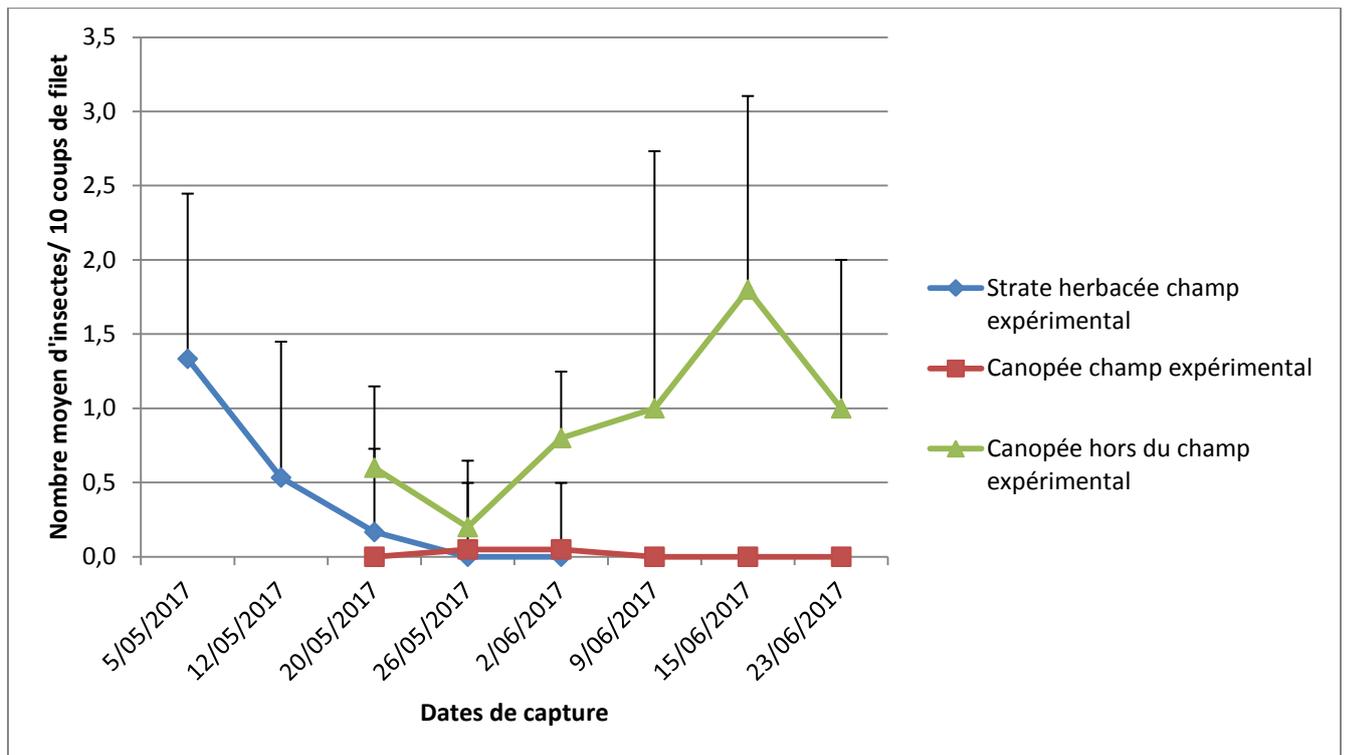


Figure 26 - Evolution du nombre moyen de cercopes des prés (*P.spumarius*) collectés hebdomadairement par 10 coups de filet dans la strate herbacée, dans les canopées des oliviers du champ expérimental et dans les canopées des oliviers en dehors de la parcelle de Squinzano.

Il n'y a pas de différence significative de *P.spumarius* dans la strate herbacée et dans les canopées. Néanmoins, le nombre de cercopes des prés capturés est beaucoup plus important dans les canopées hors du champ expérimental. La population retrouvée dans la strate herbacée tend à diminuer au cours de l'étude.

3 Evaluation de la prévalence de *Philaenus spumarius* L. naturellement infecté par *X.fastidiosa*.

3.1 Parcelle expérimentale de Vernole

3.1.1 Prévalence de *X.fastidiosa* dans *P.spumarius*

Le nombre de *P.spumarius* infectés en fonction du lieu de capture est présenté au Tableau 6.

Tableau 6 - Nombre de *P.spumarius* infectés par *X.fastidiosa* en fonction du lieu de capture.

P.spumarius	Canopées saines	Canopées infectées	Strate herbacée	Total
Insecte infecté par <i>X.fastidiosa</i>	0	4	0	4
Insecte non-infecté par <i>X.fastidiosa</i>	1	11	39	51
Total	1	15	39	55

Septante et un pourcents des cercopes des prés ont été capturés dans la strate herbacée, 27 % dans les canopées infectées et seulement 2 % dans les canopées saines.

Vingt-cinq pourcents des insectes capturés dans les canopées se sont révélés positifs à la présence de *X.fastidiosa*. Un cercope des prés positif à *X.fastidiosa* a été capturé dans la strate herbacée le 27 avril 2017 lors du test d'échantillonnage. L'évolution de l'infection de *P.spumarius* capturés dans les canopées et dans la strate herbacée est présentée à la Figure 27.

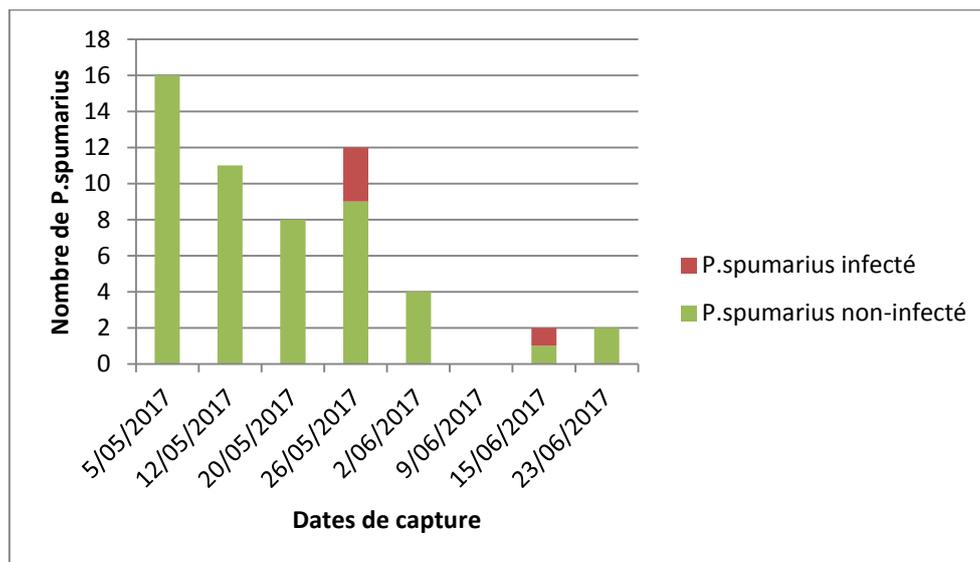


Figure 27 - Evolution du nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans les canopées et la strate herbacée du champ expérimental de Vernole

Le 26/05/2017, soit la première date d'infection, 25 % des cercopes des prés étaient infectés alors qu'un taux de 50 % d'infection était observé le 15/06/2017 pour l'ensemble des captures de la parcelle expérimentale.

L'évolution de l'infection de *P.spumarius* capturés dans les canopées est présentée à la Figure 28.

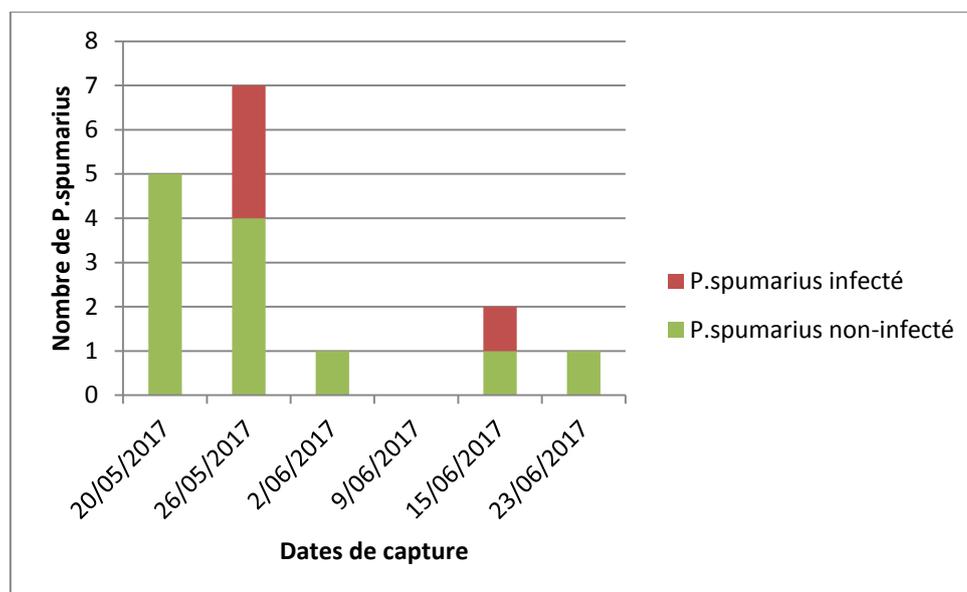


Figure 28 - Evolution du nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole

On remarque que 42,9 % des cercopes des prés collectés dans les canopées étaient infectés le 26/05/2017 et 50,0 % à la deuxième date d'infection correspondant au 15/06/2017.

Les données brutes sont présentés en ANNEXE D.

3.2 Parcelle expérimentale de Squinzano

3.2.1 Prévalence de *X.fastidiosa* dans *P.spumarius*

Le nombre de *P.spumarius* infectés en fonction du lieu de capture est présenté au Tableau 7.

Tableau 7 - Nombre de *P.spumarius* infectés par *X.fastidiosa* en fonction du lieu de capture.

P.spumarius	Canopées saines champ expérimental	Canopées infectées champ expérimental	Strate herbacée champ expérimental	Canopées hors du champ expérimental	Total
Insecte infecté par <i>X.fastidiosa</i>	0	0	0	1	1
Insecte non-infecté par <i>X.fastidiosa</i>	2	0	31	26	59
Total	2	0	31	27	60

Cinquante-deux pourcents des cercoptes des prés ont été capturés dans la strate herbacée, 45 % dans les canopées hors du champ expérimental et seulement 3% dans les canopées saines de la parcelle expérimentale. Aucun *P.spumarius* n'a été capturé dans les canopées infectées du champ expérimental.

On remarque que 3,7 % des insectes capturés dans les canopées hors du champ expérimental se sont révélés positifs à la présence de *X.fastidiosa*.

L'évolution de l'infection de *P.spumarius* capturés dans les canopées hors du champ expérimental est présentée à la Figure 29.

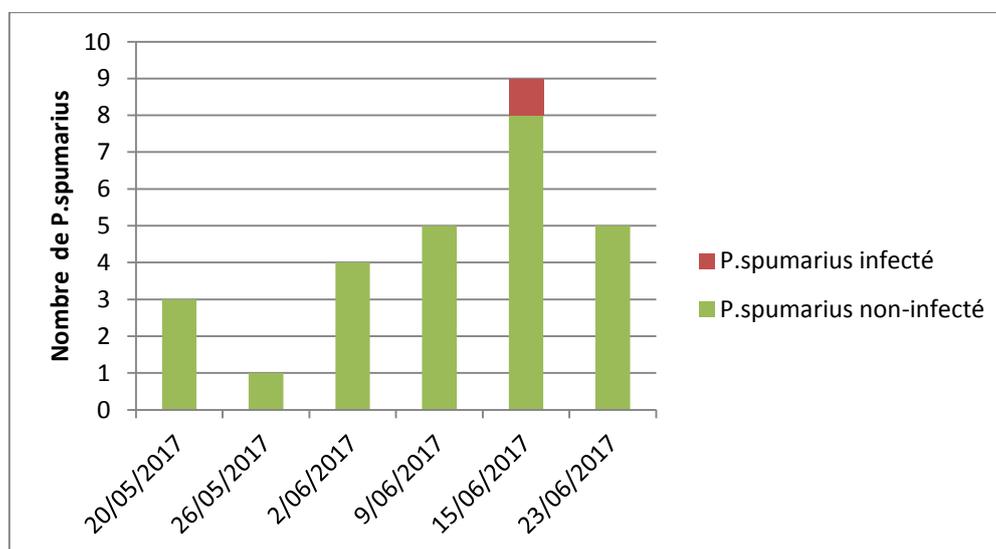


Figure 29 - Evolution du nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans les canopées des oliviers hors du champ expérimental de Squinzano.

Le 15/06/2017, seule date d'infection, 11,11% des cercoptes des prés collectés dans les canopées hors du champ expérimental étaient infectés.

1 Test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* en utilisant un nouveau modèle : *Halyomorpha halys* (Stål)

Deux jours après la mise en place des diètes, des déjections de la même couleur que la diète artificielle ont été observées dans chaque boîte contenant les punaises qui se sont donc bien alimentées de leurs diètes respectives.

Tous les individus ont survécu sur leur diète respective pendant les 4 premiers jours de l'expérimentation. Les trois diètes pouvaient donc convenir de support pour la bactérie *X.fastidiosa* afin de réaliser le test d'acquisition de 24h sans tuer l'insecte. La diète à base de jus de plantes de fève a été sélectionnée puisqu'elle était composée de la même alimentation de base des punaises et en avait la même couleur (vert foncé) ce qui pouvait augmenter les chances d'alimentation pendant le test d'acquisition de 24h.

L'âge des individus étant inconnu, il est possible que la punaise morte sur la diète artificielle à base de jus de plantes de fève était déjà en fin de vie. Elle pourrait donc être décédée d'une mort naturelle.

Les insectes nourris à la diète de jus de carottes bio et à la diète de saccharose ont survécu toute la durée de l'expérience (10 jours). Funayama (2006) avait montré que des *H. halys* femelles adultes élevées à la chair de carotte depuis le second stade nymphal pouvait survivre en moyenne $38,0 \pm 15,5$ jours sur cette même diète. L'étude préliminaire que j'ai réalisée montre également une longue durée de survie (10 jours) sur la diète à base de jus de carotte bio.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les résultats négatifs obtenus par PCR :

1. La bactérie était morte dans la diète du au choc thermique ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) donc elle ne pouvait pas se développer dans l'insecte après ingestion.
2. Les insectes ne s'étaient pas alimentés sur la diète artificielle.
3. La bactérie a été ingérée et directement expulsée lors d'une phase d'alimentation ultérieure dans le morceau de pomme bio.
4. La bactérie a été expulsée lors de déjection sans s'établir dans le corps de l'insecte.
5. La réaction PCR n'a pas fourni assez d'amplicons pour pouvoir détecter *X.fastidiosa*.

Afin de vérifier l'hypothèse 1, les diètes ont été grattées superficiellement, repiquées sur un milieu de culture spécifique à *X.fastidiosa* et incubées pendant 22 jours. Les diètes n'étant pas stériles, la coloration de Gram a révélé la présence de bactéries Gram- et Gram+ en

forme de bacille. Bien que d'autres bactéries Gram- pourraient être présentes, le milieu de culture spécifique à *X.fastidiosa*, la concentration initiale de cellules dans la diète artificielle et le grand nombre de bactérie Gram- en forme de bacille retrouvé dans le milieu de culture (Figure 30) font que la probabilité que la bactérie soit vivante dans la diète est grande mais il est impossible d'affirmer avec exactitude qu'il s'agit bien de *X.fastidiosa*. En outre, une bactérie morte est toujours détectable par PCR.

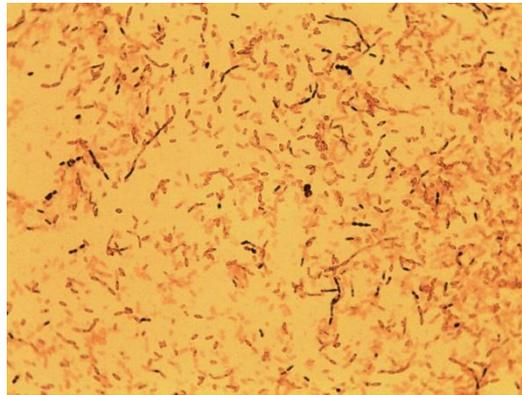


Figure 30 - Coloration de Gram des bactéries cultivées à partir de celles présentes dans les diètes artificielles (Objectif 100x) (Fievet, 2017)

L'hypothèse 2 est à considérer puisqu'une seule déjection verte a été observée dans la boîte contenant une punaise femelle et correspondant à 72h de rétention. Il est donc probable que les autres punaises ne se sont pas alimentées pendant les 24h d'acquisition.

Les Hétéroptères partagent avec les homoptères certains comportements associés à la transmission de pathogènes (Mitchell, 2004). Le mécanisme d'expulsion-salivation a déjà été montré sur un Pentatomidae, (*Euschisttls conspersus* (Uhler) (Risk (1969), cité dans (Harris et al., 1981) ce qui appuie l'hypothèse 3.

La bactérie a pu être ingérée sans se fixer sur la paroi du tube digestif et a été expulsée lors de déjection mais cette hypothèse reste à vérifier.

La limite de détection du protocole PCR était de 1×10^2 CFU/ml, chacune des 6 diètes était constituée de $16,67 \times 10^6$ CFU/ml réparties de manière homogène. A cette concentration, l'insecte qui s'alimente a normalement acquis assez de cellules bactériennes pour être au-dessus de la limite de détection ce qui écarte la dernière hypothèse.

Afin d'apporter des pistes d'amélioration à ce test, plusieurs paramètres devraient être modifiés : trouver un moyen d'autoclaver la solution à base de jus de plantes de fève et d'agarose sans provoquer de débordements afin de vérifier ultérieurement la présence de la bactérie vivante dans la diète et/ou augmenter la période d'acquisition jusqu'au dernier signe de déjections afin de s'assurer que tous les insectes se sont bien alimentés. Néanmoins, il faudra encore vérifier la survie de la bactérie pendant ce laps de temps.

2 Etude de la dynamique de *P.spumarius*, *N.campestris* ainsi que des vecteurs potentiels appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha

Le protocole d'échantillonnage des feuilles d'olivier du projet "Ge.S.Oliv" (§2.2.1.1) a été conçu de manière à être standardisé et facile à réaliser pour l'opérateur. Néanmoins, cette méthode comporte de nombreuses approximations. Concernant les arbres asymptomatiques, il est impossible de connaître la meilleure localisation d'échantillonnage parce que la vitesse de déplacement de la bactérie dans l'arbre, sa diffusion et sa concentration ne sont pas encore compris. De plus, la division en quatre quadrants desquels les rameaux sont prélevés ne représente pas le niveau d'infection réel de l'arbre. En effet, les oliviers des Pouilles sont caractérisés par leurs grandes tailles et par un volume de canopée très important, certaines branches sont donc difficilement atteignables même avec une échelle. Il est donc nécessaire d'adapter le protocole d'échantillonnage aux réalités du terrain afin de diagnostiquer le niveau réel d'infection de l'arbre.

Un autre défaut de ce protocole est la quantité de matériel végétal utilisé au laboratoire pour effectuer l'analyse. Le pétiole et la partie proximale de la nervure centrale de 20 feuilles sont broyées pour obtenir une fine poudre mais seulement 100µg de celle-ci sont prélevés pour réaliser l'analyse. Il est donc possible qu'une faible quantité de cellule bactérienne initialement présente dans une feuille ne se retrouve pas dans les 100µg du mix conduisant à un faux diagnostic. La méthode Q-PCR pour quantifier le nombre de cellules bactériennes présentes comporte également une marge d'approximation. En outre, il serait opportun de combiner une analyse visuelle des symptômes à la méthode d'échantillonnage afin de corréliser le taux d'infection aux symptômes éventuels.

Enfin, aucune méthode curative n'existe jusqu'à présent ce qui signifie que le niveau d'infection devrait évoluer avec le temps jusqu'à la mort de l'arbre. Un échantillonnage régulier permettrait de suivre l'évolution de l'infection de manière détaillée.

Indépendamment de l'hétérogénéité des deux oliveraies, la dynamique des populations *P.spumarius*, de *N.campestris* et des autres Auchenorrhyncha semble assez similaire et décroît au cours de l'étude. Cette tendance est également observée par Ben Moussa et al. (2016) qui a étudié l'abondance moyenne mensuelle des Auchenorrhyncha capturés pendant 2 ans dans 4 oliveraies connues pour être sévèrement infectées par *X.fastidiosa* dans la province de Lecce.

Dans l'étude que j'ai réalisée, la population des Auchenorrhyncha autres que *P.spumarius* et *N.campestris* n'a pas été déterminée taxonomiquement jusqu'à l'espèce, il s'agit donc du nombre total des espèces appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha, dont les vecteurs potentiels de *X.fastidiosa* font partie, pour une date donnée mais l'émergence relative des différentes espèces ainsi que les cycles biologiques ne sont pas pris en compte dans cette étude. Il est donc probable que certaines espèces d'Auchenorrhyncha disparaissent

et que d'autres apparaissent au cours de l'étude. De ce fait, l'évolution des autres insectes appartenant au sous-ordre des Auchenorrhyncha fluctue de manière non contrôlée.

Dans l'olivieraie de Vernole, les populations d'Auchenorrhyncha, de *P.spumarius* et de *N.campestris* décroissent dans la strate herbacée au fur et à mesure que la végétation autour des troncs se dessèche du aux fortes températures et au manque de pluie. Cette hypothèse est en partie confirmée par l'étude de Cornara et al., (2016) qui a montré que la population de *P.spumarius* décroît dans la strate herbacée de mai à juin du au dessèchement de sa végétation. Dans l'olivieraie de Squinzano qui était totalement enherbée, la diminution des populations de *P.spumarius*, de *N.campestris* et des autres Auchenorrhyncha est moins marquée. Le pic exceptionnel des autres Auchenorrhyncha capturés le 02 juin 2017 à Squinzano peut s'expliquer par le fait que l'agriculteur a labouré son champ autour de la parcelle expérimentale ce même jour. Les insectes se seraient donc ainsi réfugiés dans la strate herbacée de la parcelle afin de s'y nourrir. Si cette hypothèse est vérifiée, une stratégie push-pull basée sur la lutte culturale pourrait être développée en travaillant le sol pour éloigner les insectes et en laissant une bande enherbée pour les attirer afin d'y effectuer des traitements ciblés pour contrôler le vecteur de *X.fastidiosa*.

Le nombre moyen de captures totales de *P.spumarius* dans la strate herbacée est assez similaire pour les deux oliveraies, il semble donc que le fait de tondre l'herbe après l'émergence de l'adulte *P.spumarius* ne diminue pas sa population s'il reste des zones d'herbe refuges autour des troncs et le long du mur de pierre, sa population pourrait donc être simplement déplacée.

L'apport excessif de 30 tonnes d'amendement compost ainsi que 60 unités d'azote minéral par parcelle expérimentale était nécessaire pour combler le plus rapidement possible les carences du sol. La constitution de la sève des plantes de la strate herbacée et des oliviers a donc probablement été modifiée et a pu avoir une incidence sur les insectes qui s'en sont nourris. Une expérience similaire a montré qu'une fertilisation de 50kg/ha de nitrate d'ammonium sur des bruyères callunes (*Calluna vulgaris L.*) augmentait la teneur en azote des plantes. La sève xylémienne contient généralement moins de 0,01% d'azote mais en augmentant cette teneur, *P.spumarius* répondait à ce changement nutritif de la plante en étant plus abondant sur les plantes fertilisées. L'azote est un facteur limitant dans l'environnement et les insectes, qui tolèrent généralement de faibles quantités d'azote dans leur alimentation, adapteraient leur comportement alimentaire en faveur de plantes ayant une teneur en azote plus élevée. La qualité nutritionnelle des plantes est donc un facteur important dans l'abondance des insectes qui s'alimentent de sèves (Hartley & Gardner, 1995). De plus, pour la plupart des insectes herbivores, l'augmentation de la disponibilité en azote est associée à une augmentation du taux de croissance, du taux de survie et de la densité de population (Prestidge, 1982 ; William & Mattson, 1980). Horsfield (1977) avait également montré que des nymphes de *P.spumarius* présentaient une plus faible mortalité après 7 jours lorsqu'elles se nourrissaient de sève xylémienne avec une concentration relativement plus élevée en acide

aminé. Il sera donc intéressant de suivre l'évolution de la population des insectes dans ces deux oliveraies. Rétablir la fertilité des sols afin d'obtenir des plantes avec un meilleur système immunitaire pour contrôler l'infection de la *X.fastidiosa* pourrait donc également augmenter la population de vecteurs potentiels de la bactérie.

La population de *P.spumarius* et *N.campestris* semble diminuer dans les canopées de Vernole au contraire des autres Auchenorrhyncha qui augmentent légèrement. Le nombre de cercopes des prés semble être plus important dans les canopées que dans la strate herbacée à partir du 20 mai 2017 à l'exception du 02 juin 2017 qui pourrait s'expliquer par un mauvais taux de capture dans les canopées. La même tendance est observée dans l'étude de Cornara et al.(2016) sur les cercopes des prés de mai à juin 2014. L'espèce *N.campestris* est relativement peu abondante dans la canopée et dans la strate herbacée.

Par contre, dans les canopées de la parcelle expérimentale de Squinzano, les populations d'autres Auchenorrhyncha diminuent et seulement 2 *P.spumarius* et 1 *N.campestris* ont été capturés. La taille sévère des arbres réalisée sur la parcelle de Squinzano pourrait expliquer le faible nombre de cercopes des prés et *N.campestris* et la diminution des autres Auchenorrhyncha. En effet, le microclimat de la canopée a été modifié puisqu'il y avait très peu de branches qui étaient donc exposées au rayons lumineux intenses sans zone d'ombre. De plus, l'air sec et chaud pouvait donc circuler dans la canopée empêchant ainsi la formation d'une certaine humidité relative comme l'a montré Morales & Davies (2002) sur les arbres taillés à Tangelo en Floride. Il semble que ces nouvelles conditions ne soient pas favorables à la présence des espèces étudiées.

La tendance inverse aux observations de Cornara et al., (2016), c'est à dire une augmentation de la population de *P.spumarius* et des autres Auchenorrhyncha, s'observe dans les canopées hors de la parcelle expérimentale sur des arbres non taillés. Le centre de la canopée de ces arbres est complètement ombragé et une humidité relative plus importante y est présente. Ces conditions semblent donc plus favorables pour les espèces étudiées c'est pourquoi elles se réfugieraient dans ce type de canopée. Si cette hypothèse se vérifie, une lutte intégrée de type push-pull pourrait être développée pour contrôler le vecteur de *X.fastidiosa* dans la région des Pouilles en se basant sur un contrôle cultural. Les arbres taillés seraient ainsi moins attirants que les arbres non-taillés qui serviraient de plantes pièges sur lesquelles des traitements ciblés pourraient être effectués.

Il n'y a pas de différence significative entre les espèces retrouvées dans les canopées saines et infectées. Cependant, il reste utile d'identifier les espèces d'Auchenorrhyncha retrouvées dans les canopées infectées puisqu'elles sont plus susceptibles d'être en contact avec la bactérie et peuvent peut-être jouer un rôle de vecteur.

L'utilisation de pièges jaunes collants afin de capturer *P.spumarius* ne s'est pas montrée plus efficace que l'étude réalisée par Elbeaino et al. (2014) qui avait capturé 5 *P.spumarius* en plaçant 5 pièges jaunes (renouvelés tous les 20 jours) dans les canopées de 4 oliveraies sévèrement infectées par *X.fastidiosa* près de Gallipoli d'octobre à Décembre 2013.

De plus, les pièges collants sont généralement peu efficaces pour capturer les insectes se nourrissant de sève xylémienne (Purcell et al., 2014). Mais certains insectes peuvent être piégés accidentellement. Néanmoins, les pièges collants sont souvent utilisés pour les cicadelles vectrices en combinaison du piégeage au filet afin d'évaluer les mouvements de vol.

Dans l'étude que j'ai réalisée, il semble que le jaune ne soit pas une couleur attractive pour *P.spumarius*. Le pouvoir attractif d'autres couleurs devrait être étudié pour éventuellement faciliter l'échantillonnage de ce vecteur de *X.fastidiosa* avec des pièges chromo-attractifs.

3 Evaluation de la prévalence de *P.spumarius* naturellement infecté par *X.fastidiosa*

Le protocole de la PCR a été légèrement modifié en Italie suite à plusieurs échecs de réactions du témoin positif. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces échecs : l'ADN polymérase Hot Start ne s'était pas activée, des contaminations extérieures ont interféré dans la réaction, les réactifs s'étaient dégradés, etc. Après avoir doublé la quantité de primers et augmenté la quantité d'ADN polymérase Hot Start, les réactions ont repris.

Néanmoins, aucun échantillon n'a été détecté positif au laboratoire de GxABT. Le faible signal lumineux obtenu sur le gel pour témoin positif (10^5 CFU/ml) ne permettait pas une détection suffisamment marquée pour les échantillons faiblement infectés. Il est probable que le stockage des échantillons d'ADN à 4°C dans de l'eau stérile en soit une des causes.

Lors du test d'échantillonnage du 27 avril 2017, un cercope des prés capturé dans la strate herbacée de Vernole a été détecté positif à *X.fastidiosa*. Aucune étude n'a montré de cercopes de prés infectés par la bactérie dans la strate herbacée avant le mois de juillet. Cet insecte a donc pu acquérir *X.fastidiosa* dans la canopée d'un olivier infecté avant de redescendre dans la strate herbacée mais ce mouvement n'est observé qu'à la fin du mois de juillet dans l'étude de Cornara et al., (2016). Il est aussi possible que cet insecte ait acquis la bactérie depuis une autre plante hôte comme l'oléandre située à quelques centaines de mètres de l'olivieraie. Cette hypothèse est également soutenue par Cornara et al., (2016) dans une autre de ces études sur la transmission de la *X.fastidiosa* à différentes plantes hôtes.

L'acquisition de la bactérie par *P.spumarius* depuis un olivier infecté est plus efficace que depuis une oléandre infectée (Cornara et al., 2016) mais la transmission de la bactérie par *P.spumarius* est plus efficace à l'oléandre qu'à l'olivier (Cornara et al., 2016). Il est donc probable qu'une proportion importante de vecteurs présents dans l'olivieraie s'infecte en s'alimentant dans les canopées des oliviers infectés. Cependant, le nombre important d'oléandres qui bordent les routes est une source d'inoculum de *X.fastidiosa* non négligeable.

La prévalence de *P.spumarius* infectés par *X.fastidiosa* est donc plus importante dans la canopée que dans la strate herbacée (absence de plantes hôtes) où aucun insecte infecté n'a été détecté au cours de l'étude dans les deux oliveraies. Les 4 insectes infectés à Vernole ont été retrouvés dans les canopées infectées le 26 mai et le 15 juin 2017 avec des taux respectifs d'infection de 42,9 % sur 7 insectes capturés et 50,0 % sur 2 insectes capturés. L'étude de Cornara et al. (2016) montre des taux d'infection de *P.spumarius* de $\pm 25,0$ % sur 142 insectes capturés le 28 mai et de $\pm 40,0$ % sur 147 insectes capturés le 12 juin 2015. Le nombre trop faible d'individus testés dans mon étude peut donc être difficilement comparé au taux d'infection aux mêmes dates à Gallipoli en 2015. Il faudrait donc augmenter le nombre d'échantillonnages et/ou le nombre d'opérateurs pour maximiser les collectes.

Néanmoins, le taux d'infection de *P.spumarius* s'élevait du 20 mai au 23 juin 2017 à 25,0 % sur 16 insectes capturés dans toutes les canopées confondues et à 26,67 % sur 15 insectes capturés dans les canopées infectées. Il s'élevait à $\pm 44,0$ % sur 425 insectes capturés dans les canopées infectées pendant la même période de temps en 2015 près de l'épicentre Gallipoli où l'étude de Cornara et al., (2016) a été réalisée sur des oliviers sévèrement touchés par la *X.fastidiosa* (100% d'arbres symptomatiques). Le taux d'infection plus faible de *P.spumarius* à Vernole pourrait donc s'expliquer de différentes façons : le nombre d'insectes capturés n'était pas suffisamment élevé pour obtenir un taux d'infection éventuellement plus important. Vernole est distant d'une quarantaine de kilomètres de l'épicentre Gallipoli et peu de symptômes sont visibles sur les oliviers et certains sont même asymptomatiques. La plus faible sévérité de l'infection à Vernole pourrait donc expliquer une prévalence plus faible de *P.spumarius* infectés par *X.fastidiosa*.

Un seul cercope des prés infecté a été capturé le 15 juin 2017 dans les canopées en dehors de la parcelle expérimentale de Squinzano, ce qui représentait un taux d'infection de 11,11 % sur 9 insectes capturés. Le taux d'infection de *P.spumarius* à Squinzano s'élevait du 20 mai au 23 juin 2017, en dehors de la parcelle expérimentale, à 3,70 % sur 27 insectes capturés. En plus des mêmes explications des résultats de Vernole, le niveau d'infection de ces arbres n'était pas connu, il est donc probable que ces insectes aient été en contact avec une charge bactérienne faible voire même inexistante sur certains arbres ce qui pourrait expliquer ce résultat.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Quatre ans après sa détection en Europe, les mesures d'éradication de *Xylella fastidiosa* ordonnées par la Commission européenne ne semblent pas stopper l'expansion de la bactérie dans le sud de l'Italie. Il existe peu d'études sur les vecteurs potentiels européens de *X.fastidiosa* et les connaissances sur le vecteur *P.spumarius* en Europe en sont à leur début. De plus, la présence de vecteurs potentiels différents de ceux de la région des Pouilles ont été identifiés dans les régions frontalières.

Afin d'apporter des pistes d'amélioration contre l'expansion de la *X.fastidiosa* en Europe et dans d'autres zones du monde, une approche multidisciplinaire est nécessaire. La compréhension de ses interactions avec les insectes vecteurs potentiels mais également avec d'autres insectes modèles est primordiale. La biologie, l'écologie ainsi que la dynamique comportementale de ces insectes doivent également être comprises dans chaque agro-écosystème afin d'adapter des mesures de contrôles efficaces.

Le test préliminaire d'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* par la punaise *Halyomorpha halys* ne permet pas actuellement de comprendre les interactions entre ces deux organismes. Enfin, si ces résultats se vérifient, après optimisation du protocole, cela ouvre une piste majeure de recherche sur l'inhibition de l'acquisition de la bactérie *X.fastidiosa* dans les insectes vecteurs. Comprendre et caractériser les liens entre le microbiome intestinal de l'insecte et la bactérie apporterait peut-être à terme une piste pour gérer l'expansion de la *X.fastidiosa*.

Les connaissances actuelles sur la dynamique de *P.spumarius*, de *N.campestris* ainsi que des autres Auchenorrhyncha dans les oliveraies du Salento au printemps semblent globalement se confirmer par cette étude malgré l'hétérogénéité des deux oliveraies.

La prévalence de *P.spumarius* infectés par la bactérie dans les oliveraies étudiées présente un taux inférieur à celui observé près de l'épicentre aux alentours de Gallipoli.

Afin d'alimenter les connaissances sur les vecteurs potentiels de la *X.fastidiosa*, il serait intéressant d'identifier taxonomiquement les espèces des Auchenorrhyncha capturées sur les oliviers infectés ainsi que de détecter la présence de la bactérie dans ceux-ci et pouvoir tester ainsi leur éventuelle capacité vectrice.

La population des insectes semble diminuer dans les arbres sévèrement taillés au contraire des arbres non-taillés utilisés comme plante refuge. En outre, la population des insectes étudiés semble augmenter dans les zones d'enherbement utilisées comme refuge après labour de la parcelle. Ces observations nécessitent une recherche approfondie afin de développer une méthode push-pull avec contrôle cultural des oliveraies visant à concentrer la population des vecteurs potentiels et du vecteur connu de *X.fastidiosa* sur des zones où des

traitements insecticides localisés pourraient être développés dans une approche globale et de lutte intégrée.

De plus, l'emploi de substances répulsives naturelles telles que les huiles essentielles et une meilleure connaissance des plantes hôtes de *P.spumarius* pourraient également faire l'objet d'une méthode push-pull afin d'expérimenter une hypothèse de résolution au contrôle biologique de *P.spumarius* et des vecteurs potentiels.

Il est toutefois impératif de veiller à faire appliquer strictement les mesures de contrôle du vecteur de *X.fastidiosa* imposée par la région des Pouilles à savoir la tonte de l'herbe avant le 1er mai dans les oliveraies afin de diminuer l'émergence des vecteurs adultes. Toutefois, ces mesures seules ne semblent pas suffisantes pour endiguer l'expansion de la bactérie. En effet, le nombre important d'oliveraies abandonnées et le nombre important d'oléandres, sources d'inoculum de *X.fastidiosa*, omniprésentes dans l'environnement proche des oliveraies, nécessiteraient d'être pris en compte dans les mesures de contrôle actuellement mises en œuvre.

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almeida, R. P. P., Nascimento, F. E., Chau, J., Prado, S. S., Tsai, C., Lopes, A., & Lopes, J. R. S. (2008). Genetic Structure and Biology of *Xylella fastidiosa* Strains Causing Disease in Citrus and Coffee in Brazil □, 74(12), 3690–3701.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02388-07>
- Almeida, R. P. P., Pereira, E. F., Entomologia, D. De, Agrícola, Z., Universidade, E., Paulo, D. S., ... Lopes, J. R. S. (2001). Multiplication and Movement of a Citrus Strain of *Xylella fastidiosa* Within Sweet Orange, 85(4), 382–386.
- Almeida, R. P. P., & Purcell, A. H. (2003). Transmission of *Xylella fastidiosa* to Grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae), 96(2), 264–271.
- Archibald, R. D., Cox, J. M., & Deitz, L. L. (1979). New Zealand Journal of Agricultural New records of plant pests in New Zealand, (October 2014), 37–41.
<https://doi.org/10.1080/00288233.1979.10420862>
- Backus, E. A., Holmes, W. J., Schreiber, F., Reardon, B. J., Walker, G. P., Backus, E. A., ... Reardon, B. J. (2009). Sharpshooter X Wave : Correlation of an Electrical Penetration Graph Waveform with Xylem Penetration Supports a Hypothesized Mechanism for *Xylella fastidiosa* Inoculation Sharpshooter X Wave : Correlation of an Electrical Penetration Graph Waveform With Xy, (102), 847–867.
- Backus, E. A., Shugart, H. J., Rogers, E. E., Morgan, J. K., & Shatters, R. (2014). Direct Evidence of Egestion and Salivation of *Xylella fastidiosa* Suggests Sharpshooters Can Be “ Flying Syringes .”
- Bariselli, M., Bugiani, R., & Maistrello, L. (2016). Distribution and damage caused by *Halyomorpha halys* in Italy, 0, 1–3. <https://doi.org/10.1111/epp.12289>
- Ben Moussa, I. E., Mazzoni, V., Valentini, F., Yaseen, T., Lorusso, D., Speranza, S., ... Onghia, A. M. D. (2016). Seasonal Fluctuations of Sap-Feeding Insect Species Infected by *Xylella fastidiosa* in Apulian Olive Groves of Southern Italy, 109(July), 1512–1518.
<https://doi.org/10.1093/jee/tow123>
- CABI. (2015). *Philaenus spumarius* (meadow froghopper). Retrieved from <http://www.cabi.org/isc/datasheet/40235>
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., Stradis, A. De, Loconsole, G., Nigro, F., ... Potere, O. (2014). ISOLATION OF A XYLELLA FASTIDIOSA STRAIN INFECTING OLIVE AND OLEANDER IN APULIA , ITALY, 96, 425–429.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., & Bov, 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*, 27(October 1992), 137–142.

- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P., & Lindow, S. (2008). Living in two Worlds : The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*, 243–273.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094342>
- Chen, J., Groves, R., Civerolo, E. L., Viveros, M., Freeman, M., & Zheng, Y. (2005). Two *Xylella fastidiosa* Genotypes Associated with Almond Leaf Scorch Disease on the Same Location in California, (iii).
- Chmiel, S. M., & Wilson, M. C. (1979). Estimation of the Lower and Upper Developmental Threshold Temperatures and Duration of the Nymphal Stages of the Meadow Spittlebug, *Philaenus spumarius*, 682–685.
- Commission européenne. (2017a). COMMISSION DATABASE OF HOST PLANTS FOUND TO BE SUSCEPTIBLE TO *XYLELLA FASTIDIOSA* IN THE UNION TERRITORY – UPDATE 9.
- Commission européenne. (2017b). Emergency control measures - *Xylella fastidiosa*. Retrieved from
https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa_en
- Conseil oléicole international. (2017). L'oléiculture en Italie - Marché oléicole.
- Cornara, D., Cavalieri, V., Dongiovanni, C., Altamura, G., Palmisano, F., Bosco, D., & Porcelli, F. (2016). Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera , Aphrophoridae) to different host plants, 141, 80–87.
<https://doi.org/10.1111/jen.12365>
- Cornara, D., Saponari, M., Zeilinger, A. R., Stradis, A. De, Boscia, D., Loconsole, G., ... Martelli, G. P. (2016). Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. *Journal of Pest Science*. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0793-0>
- Cornara, D., Sicard, A., Zeilinger, A. R., Porcelli, F., Purcell, A. H., & Almeida, R. P. P. (2016). Transmission of *Xylella fastidiosa* to Grapevine by the Meadow Spittlebug, 106(11).
- Daugherty, M. P., Lopes, J., & Almeida, R. P. P. (2010). Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen, 360–366.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01189.x>
- Davis, C. J., & Mitchell, A. L. (1946). Host records of *Philaenus sumarius* (L.) at Kilauea.Hawaii National Park (Homoptera, Cercopidae), XII(3), 515–516.
- Davis, M. J., Purcell, A. H., & Thomson, S. V. (1978). Pierce's Disease of Grapevines : Isolation of the Causal Bacterium, (February 1978).
<https://doi.org/10.1126/science.199.4324.75>
- De Jong, Y. (2013). Fauna Europae version2.6. Retrieved from <http://www.faunaeur.org>
- Drosopoulos, S., & Asche, M. (1991). Biosystematic studies on the spittlebug genus *Philaenus* with the description of a new species, 169–177.

- EFSA. (2015). Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory , with the identification and evaluation of risk reduction options 1, 13(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>
- Elbeaino, T., Yaseen, T., Valentitni, F., Ben Moussa, I. E., Mazzoni, V., & D'onghia, A. M. (2014). Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy, 328–332. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- EPPO. (2016). EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Retrieved from <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA1.htm>
- FAOSTAT. (2017). La production par culture (tonnes) en Italie. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>
- Funayama, K. (2006). A new rearing method using carrots as food for the brown-marmorated stink bug , *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera : Pentatomidae), 41(3), 415–418. <https://doi.org/10.1303/aez.2006.415>
- Germain, J.-F. (2016). *Philaenus spumarius* - Fact sheet.
- Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Saponari, M., Donvito, G., Italiano, A., & Loconsole, G. (2015). Draft Genome Sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO Strain, 3(1), 3–4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01538-14>. Copyright
- Goheen, A. C., Nyland, G., & Lowe, S. K. (1972). Association of a Rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines.
- Harris, K. F., Treur, B., Tsai, J., & Toler, R. (1981). Observations on Leafhopper Ingestion-Egestion Behavior: Its Likely Role in the Transmission of Noncirculative Viruses and Other Plant Pathogens, 453, 446–453.
- Hartley, S., & Gardner, S. (1995). The response of *Philaenus spumarius* (Homoptera : Cercopidae) to fertilizing and shading its moorland host-plant (*Calluna vulgaris*), 396–399.
- Hernandez-Martinez, R., Cooksey, D. A., & Wong, F. P. (2009). Leaf Scorch of Purple-Leafed Plum and Sweetgum Dieback : Two New Diseases in Southern California Caused by *Xylella fastidiosa* Strains with Different Host Ranges.
- Hill, B. ., & Purcell, A. . (1995). Acquisition and Retention of *Xylella fastidiosa* by an Efficient Vector, *Graphocephala atropunctata*.
- Hill, B. L., & Purcell, A. H. (1997). Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector, 87(12), 1197–1201.
- Hoebeke, E. R., & Carter, M. E. (2003). *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera : Pentatomidae) : A polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America, (December).
- Hopkins, D. L. (1979). EFFECT OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS ON PIERCE DISEASE OF GRAPEVINE IN FLORIDA, 284–285.

- Hopkins, D. L., & Mollenhauer, H. H. (1973). Rickettsia-like Bacterium Associated with Pierce's Disease of Grapes, *179*(2).
- Hopkins, D. L., & Purcell, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of Grapevine and other emergent diseases, *86*(10).
- Horsfield, D. (1977). Relationships between feeding of *Philaenus spumarius* (L .) and the amino acid concentration in the xylem sap, 259–266.
- Horsfield, D. (1978). EVIDENCE FOR XYLEM FEEDING BY *PHILAENUS SPUMARIUS* (L .) (HOMOPTERA : CERCOPIIDAE), *24*, 95–99.
- Ismea. (2016). Olio di oliva - Scheda di settore.
- Janse, J. D., & Obradovic, A. (2010). *XYLELLA FASTIDIOSA* : ITS BIOLOGY , DIAGNOSIS , CONTROL AND RISKS, 92.
- Journal officiel de l'Union européenne. (2016). Propagation de la *Xylella fastidiosa* affectant les oliviers, 2015–2017.
- Killiny, N., & Almeida, R. P. P. (2009). *Xylella fastidiosa* Afimbrial Adhesins Mediate Cell Transmission to Plants by Leafhopper Vectors □, *75*(2), 521–528.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01921-08>
- Knight, W., & Webb, M. (1993). The phylogenetic relationships between virus vector and other genera of macrosteline leafhoppers , including descriptions of new taxa (Homoptera : Cicadellidae : Deltocephal i nae), 11–55.
- Krell, R. K., Boyd, E. A., Nay, J. E., Park, Y., & Perring, T. (2007). Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, *58*, 211–216.
- La banque mondiale. (2017a). Agriculture, valeur ajoutée (% du PIB). Retrieved from <http://donnees.banquemondiale.org/indicateur/NV.AGR.TOTL.ZS?locations=IT&view=chart>
- La banque mondiale. (2017b). Emplois dans l'agriculture (% du total des emplois). Retrieved from <http://donnees.banquemondiale.org/indicateur/SL.AGR.EMPL.ZS?end=2015&locations=IT-EU&start=1977&view=chart>
- Lavigne, R. (1959). Biology of *Philaenus leucophthalmus* (L.) in Massachusetts, 3–6.
- Li, W., Pria, W. D., Teixeira, D. C., Miranda, V. S., Ayres, A. J., Franco, C. F., ... Beltsville, U. (2001). Coffee Leaf Scorch Caused by a Strain of *Xylella fastidiosa* from Citrus, *2350*(16).
- Lopes, J. R. S., Landa, B. B., & Ferreres, A. (2014). A survey of potential insect vectors of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* in three regions of Spain, *12*(3), 795–800.
- Maistrello, L., Bariselli, M., & Mazzoli, G. L. (2013). CITIZEN SCIENCE AND EARLY DETECTION : the example of first occurrences of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* in Italy.

- Mejdalani, G. (1998). MORFOLOGIA EXTERNA DOS CICADELLINAE (HOMOPTERA , CICADELLIDAE): COMPARAÇÃO ENTRE VERSIGONALIA MELICHAR (PROCONIINI), COM NOTAS SOBRE OUTRAS ESPÉCIES, *15*(2), 451–544.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., & Hoch, H. C. (2005). Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility, *187*(16), 5560–5567. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5560>
- Miles, P. W. (1972). The Saliva of Hemiptera, 183–255.
- Ministère français de l’agriculture de l’agroalimentaire et de la forêt. (2015). Les politiques agricoles à travers le monde - Italie, 1–4.
- Mircetich, S. M., Lowe, S. K., Moller, W. J., & Nyland, G. (1976). Etiology of Almond Leaf Scorch Disease and Transmission of the Causal Agent.
- Mitchell, P. L. (2004). Heteroptera as Vectors of Plant Pathogens, 519–545.
- Morales, P., & Davies, F. S. (2002). PRUNING AND SKIRTING EFFECTS ON CANOPY MICROCLIMATE , GROWTH , AND FLOWERING OF ORLANDO TANGELO TREES, 22–26.
- Nault, L. R., & Rodriguez, J. G. (1985). The leafhoppers and planthoppers.
- Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., & Lindow, S. E. (2004). Cell – cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants.
- Nielsen, A. L., & Hamilton, G. C. (2009). Life History of the Invasive Species *Halyomorpha halys* (Hemiptera : Pentatomidae) in Northeastern United States, (Hoffman 1931), 608–616.
- Nilakhe, S., & Buainain, C. M. (1988). OBSERVATIONS ON MOVEMENT OF SPITTLEBUG ADULTS, *23*(2), 123–134.
- Nunney, L., Vickerman, D. B., Bromley, R. E., Russell, S. A., Hartman, J. R., & Morano, L. D. (2013). Recent Evolutionary Radiation and Host Plant Specialization in the *Xylella fastidiosa* Subspecies Native to the United States, *79*(7), 2189–2200. <https://doi.org/10.1128/AEM.03208-12>
- Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R., Hartung, J., Montero-astu, M., Ortiz, B., & Stouthamer, R. (2010). Population Genomic Analysis of a Bacterial Plant Pathogen : Novel Insight into the Origin of Pierce ’ s Disease of Grapevine in the U . S . , *5*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015488>
- OlioPuglia. (2014). Crolla in Italia la produzione dell’olio nel 2014, prezzi in aumento. Retrieved from <http://www.oliopuglia.it/index.php/la-puglia-e-lolio>
- Ossiannilsson, F. (1981). The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 2. In *Fauna Entomology Scandinavica* (pp. 223–593).
- Paiaõ, F. G., Meneguim, A. M., Casagrande, E. C., & Leite, R. P. (2002). Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro, *27*, 67.

- Pierce. (1892). The California vine disease.
- Pollard, D. G. (1968). Stylet penetration and feeding damage of *Eupteryx melissae cuetis* (hemiptera, cicadellidae) on sage, 55–71.
- Prestidge, R. A. (1982). Instar duration, adult consumption, oviposition and nitrogen utilization efficiencies of leafhoppers feeding on different quality food (Auchenorrhyncha: Homoptera), 91–101.
- Purcell, A. ., Porcelli, F., Cornara, D., Bosco, D., & Picciau, L. (2014). Characteristics and identification of xylem-sap-feeders.
- Purcell, A. H. (1980). Almond Leaf Scorch : Leafhopper and Spittlebug Vectors, 834–838.
- Purcell, A. H., & Finlay, A. (1979). Evidence for Noncirculative Transmission of Pierce's Disease Bacterium by Sharpshooter Leafhoppers, 69(4), 393–395.
- Purcell, A. H., Saunders, S. R., Hendson, M., Grebus, M. E., & Henry, M. J. (1999). Causal Role of *Xylella fastidiosa* in Oleander Leaf Scorch Disease, 89(1).
- Raju, B. ., Wells, J. ., Nyland, G., Branlisky, R. ., & Lowe, S. . (1982). Plum Leaf Scald: Isolation, Culture, and Pathogenicity of the Causal Agent.
- Raven, J. A. (1984). Phytophages of Xylem and Phloem : a Comparison of Animal and Plant Sap-feeders.
- Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, R. S., Blua, M. J., Iii, R. F. M., & Andersen, P. C. (2004). The Biology of Xylem Fluid-Feeding Insect Vectors Of *Xylella fastidiosa* And Their Relation To Disease Epidemiology. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403>
- Sanderlin, R. S., & Heyderich-Alger, K. I. (2000). Evidence that *Xylella fastidiosa* Can Cause Leaf Scorch Disease of Pecan, 84(12), 1282–1286.
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F., & Martelli, G. P. (2013). IDENTIFICATION OF DNA SEQUENCES RELATED TO *XYLELLA FASTIDIOSA* IN OLEANDER, ALMOND AND OLIVE TREES EXHIBITING LEAF SCORCH SYMPTOMS IN APULIA (SOUTHERN ITALY), 95, 5442911.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., Stradis, A. D. E., Boscia, D., ... Porcelli, F. (2014). Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera : Aphrophoridae) in Apulia , Italy, (1989), 2–5.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. B., & Chang, C. (2004). *Xylella fastidiosa* subspecies : *X. fastidiosa* subsp piercei , subsp . nov ., *X. fastidiosa* subsp . multiplex subsp . nov ., and *X. fastidiosa* subsp . pauca subsp . nov ., 300, 290–300.
- 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*, 71(7), 3832–3839. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3832>
- Severin, H. H. . (1950). *Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus*.

- Sogawa, K. (1982). THE RICE BROWN PLANTHOPPER : Feeding Physiology and Host Plant Interactions, (46), 49–73.
- Stewart, A. J. A., Lees, D. R., & Lees, R. (1996). The colour / pattern polymorphism of *Philaenus spumarius* (L .) (Homoptera : Cercopidae) in England and Wales, 351(1335), 69–89.
- Su, C., Chang, C. J., Chang, C., Shih, H., Tzeng, K., & Jan, F. (2013). Pierce ’ s Disease of Grapevines in Taiwan : Isolation , Cultivation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, 396, 389–396. <https://doi.org/10.1111/jph.12075>
- University of California’s Agricultural Experiment Station - Berkley. (2017). *Xylella fastidiosa* - vectors. Retrieved from <https://nature.berkeley.edu/xylella/biology/insect-vectors/>
- Weaver, C. R., & King, D. R. (1954). Meadow spittlebug.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H., Weisburg, W. G., Mandelco-paul, L., & Brenner, D. O. N. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov. Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:136-143., 37(2), 136–143.
- Wells, J. M., Raju, B. C., & Nyland, G. (1983). Isolation, Culture, and Pathogenicity of the Bacterium Causing Phony Disease of Peach.
- William, J., & Mattson, J. (1980). Herbivory in relation to plant nitrogen content.
- Wilson, M., Turner, J., & McKamey, S. (2009). Sharpshooter leafhoppers (Hemiptera: Cicadellinae). An illustrated checklist. Part 1: Old World Cicadellini - Studies in terrestrial and freshwater biodiversity and systematics from the National Museum of Wales.
- 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, 100(6), 601–611.
- Yurtsever, S. (2000). On the Polymorphic Meadow Spittlebug , *Philaenus spumarius* (L.) (Homoptera : Cercopidae), 24, 447–459.
- Zajac, M. A., & Wilson, M. C. (1984). The effects of nymphal feeding by the meadow spittlebug , *Philaenus spumarius* (L.) on strawberry yield and quality, 3, 167–175.
- Zeilinger, A. R., & Daugherty, M. P. (2014). Vector preference and host defense against infection interact to determine disease dynamics, (November 2013), 613–622. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.01074.x>
- Zhu, G., Bu, W., Gao, Y., & Liu, G. (2012). Potential Geographic Distribution of Brown Marmorated Stink Bug Invasion (*Halyomorpha halys*), 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031246>

ANNEXES

ANNEXE A

 Ref. Ares(2017)3824160 - 31/07/2017



EUROPEAN COMMISSION
DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY

Brussels, 28.07.2017

COMMISSION DATABASE OF HOST PLANTS FOUND TO BE SUSCEPTIBLE TO *XYLELLA FASTIDIOSA* IN THE UNION TERRITORY – UPDATE 9

List of host plants referred to in Article 1(b) of Commission Implementing Decision (EU) 2015/2417 of 17 December 2015, which have been found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* in the Union territory, or, where a Member State has demarcated an area with regard to only one or more subspecies of *Xylella fastidiosa* pursuant to the second subparagraph of Article 4(1) of that Decision, as having been found to be susceptible to that or those subspecies.

Host plant found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*

Cistus mospeliensis L.

Prunus avium L.

Streptocarpus

Erysimum

Vitis vinifera L.

Host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex*

Acacia dealbata Link

Acer pseudoplatanus L.

Anthyllis hermanniae L.

Artemisia arborescens L.
Asparagus acutifolius L.
Calicotome villosa (Poiret) Link
Cercis siliquastrum L.
Cistus creticus L.
Cistus monspeliensis L.
Cistus salviifolius L.
Coronilla valentina L.
Cytisus scoparius (L.) Link
Cytisus villosus Pourr.
Ficus carica L.
Fraxinus angustifolia Vahl
Genista x spachiana (syn. *Cytisus racemosus* Broom)
Genista corsica (Loisel.) DC.
Genista ephedroides DC.
Hebe
Helichrysum italicum (Roth) G. Don
Lavandula angustifolia Mill.
Lavandula dentata L.
Lavandula stoechas L.
Lavandula x allardii (syn. *Lavandula x heterophylla*)
Lavandula x intermedia
Metrosideros excelsa Sol. ex Gaertn.
Myrtus communis L.
Olea europaea L.
Pelargonium graveolens L'Hér

Phagnalon saxatile (L.) Cass.

Prunus cerasifera Ehrh.

Prunus domestica L.

Quercus suber L.

Rosa canina L.

Spartium junceum L.

Westringia fruticosa (Willd.) Druce

Host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*

Acacia saligna (Labill.) Wendl

Asparagus acutifolius L.

Catharanthus

Chenopodium album L.

Cistus creticus L.

Dodonaea viscosa Jacq.

Eremophila maculata F. Muell.

Erigeron sumatrensis Retz.

Erigeron bonariensis L.

Euphorbia terracina L.

Grevillea juniperina L.

Heliotropium europaeum L.

Laurus nobilis L.

Lavandula angustifolia Mill.

Lavandula stoechas L.

Myrtus communis L.

Myoporum insulare R. Br.

Olea europaea L.

Pelargonium x fragrans

Phillyrea latifolia L.

Prunus avium (L.) L.

Rhamnus alaternus L.

Spartium junceum L.

Vinca

Westringia fruticosa (Willd.) Druce

Westringia glabra L.

Host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* - irrespective of the subspecies -

Coffea

Lavandula dentata L.

Nerium oleander L.

Polygala myrtifolia L.

Prunus dulcis (Mill.) D.A. Webb

Rosmarinus officinalis L.

ANNEXE B

Protocole d'extraction ADN d'insectes

CTAB-BASED TOTAL NUCLEIC ACID EXTRACTION FROM INSECTS

1. Homogenize the excised insect tissue in a 2 ml tube with 1-2 tungsten carbide beads (for max 15-20 sec at 24/sec frequency, in Mill300 mixer (Qiagen)).
2. Add in each tube 500 µl of CTAB and mix well by shaking or vortexing.
3. Heat the samples at 65°C for 20 minutes.
4. Add 500 µl of Chloroform:Isoamyl Alcohol 24:1 and mix well by shaking or vortexing.
5. Centrifuge sample at 13,000 rpm for 10 minutes. Transfer 400 µl to a 1.5 ml microcentrifuge tube and add 240 µl (approximately 0.6 V) of cold 2-Propanol. Mix by inverting 2 times. Incubate at 4°C or -20°C for 20 minutes.
6. Centrifuge the samples at 13,000 rpm for 20 minutes and decant the supernatant.
7. Wash pellet with 1ml of 70% ethanol.
8. Centrifuge sample at 13,000 rpm for 10 minutes and decant 70% ethanol.
9. Air dry the samples or use the vacuum.
10. Re-suspend the pellet in 70 µl of TE or RNase- and DNase-free water.
11. Extracts of total nucleic acid can be stored at 4° C for immediate use or at -20°C for use in the future.
12. Determine the concentration at the spectrophotometer (Nanodrop 1000 or similar). Read the absorption (A) at 260nm and at 280 nm. Optimal A260/280 ratio should be close to 2 for high quality nucleic acid.
13. Adjust the concentration to 50-100ng/µl, and use 2 µl (in a final volume of 20-25µl) to set up the conventional and real time PCR reactions.

BUFFER REQUIRED FOR THE EXTRACTION:

CTAB BUFFER

- 2% CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide) (any vendor)
- Autoclaved 0.1M TrisHCl PH 8 (any vendor)
- Autoclaved 20mM EDTA (any vendor)
- Autoclaved 1.4M NaCl (any vendor)
- 1% PVP-40

ANNEXE C

Parcelle expérimentale de Vernole.

Tableau 1 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans le champ expérimental de Vernole.

Dates	<i>P.spumarius</i>	<i>N.campestris</i>	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
5/05/2017	16	5	44		65
12/05/2017	11	1	19		31
20/05/2017	8	3	32		43
26/05/2017	12	0	43		55
2/06/2017	4	0	21		25
9/06/2017	0	0	17		17
15/06/2017	2	0	24		26
23/06/2017	2	0	24		26
Total	55	9	224		288

Tableau 2 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans la strate herbacée du champ expérimental de Vernole.

Dates	<i>P.spumarius</i>	<i>N.campestris</i>	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
5/05/2017	16	5	44		65
12/05/2017	11	1	19		31
20/05/2017	3	2	23		28
26/05/2017	5	0	20		25
2/06/2017	3	0	7		10
9/06/2017	0	0	6		6
15/06/2017	0	0	9		9
23/06/2017	1	0	4		5
Total	39	8	132		179

Tableau 3 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Vernole.

Dates	<i>P.spumarius</i>	<i>N.campestris</i>	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
20/05/2017	5	1		9	15
26/05/2017	7	0		23	30
2/06/2017	1	0		14	15
9/06/2017	0	0		11	11
15/06/2017	2	0		15	17
23/06/2017	1	0		20	21
Total	16	1		92	109

Tableau 4 - Nombre de cercopes des prés (*P.spumarius*) collectés hebdomadairement dans le champ expérimental de Vernole.

Dates	Strate	Canopée	Total
	herbacée		
5/05/2017	16	n.d	16
12/05/2017	11	n.d	11
20/05/2017	3	5	8
26/05/2017	5	7	12
2/06/2017	3	1	4
9/06/2017	0	0	0
15/06/2017	0	2	2
23/06/2017	1	1	2
Total	39	16	55

Parcelle expérimentale de Squinzano.

Tableau 5 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans le champ expérimental de Squinzano.

Dates	<i>P.spumarius</i>	<i>N.campestris</i>	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
5/05/2017	20	2		43	65
12/05/2017	8	9		13	30
20/05/2017	3	15		31	49
26/05/2017	1	2		50	53
2/06/2017	1	0		124	125
9/06/2017	0	1		6	7
15/06/2017	0	0		5	5
23/06/2017	0	0		2	2
Total	33	29		274	336

Tableau 6 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans la strate herbacée du champ expérimental de Squinzano.

Dates	P.spumarius	N.campestris	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
5/05/2017	20	2	43		65
12/05/2017	8	9	13		30
20/05/2017	3	15	31		49
26/05/2017	0	2	42		44
2/06/2017	0	0	114		114
Total	31	28	243		302

Tableau 7- Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans les canopées des oliviers du champ expérimental de Squinzano.

Dates	P.spumarius	N.campestris	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
20/05/2017	0	0	0		0
26/05/2017	1	0	8		9
2/06/2017	1	0	10		11
9/06/2017	0	1	6		7
15/06/2017	0	0	5		5
23/06/2017	0	0	2		2
Total	2	1	31		34

Tableau 8 - Nombre d'insectes collectés hebdomadairement dans les canopées des oliviers hors du champ expérimental de Squinzano.

Dates	P.spumarius	N.campestris	Autres		Total
			Auchenorrhyncha	Auchenorrhyncha	
20/05/2017	3	2	0		5
26/05/2017	1	0	0		1
2/06/2017	4	0	2		6
9/06/2017	5	0	1		6
15/06/2017	9	0	3		12
23/06/2017	5	0	14		19
Total	27	2	20		49

Tableau 9 - Nombre de cercopes des prés (*P.spumarius*) collectés hebdomadairement dans le champ et hors du champ expérimental de Squinzano.

Dates	Strate herbacée champ expérimental	Canopée champ expérimental	Canopée hors du champ expérimental	Total
5/05/2017	20	n.d	n.d	20
12/05/2017	8	n.d	n.d	8
20/05/2017	3	0	3	6
26/05/2017	0	1	1	2
2/06/2017	0	1	4	5
9/06/2017	n.d	0	5	5
15/06/2017	n.d	0	9	9
23/06/2017	n.d	0	5	5
Total	31	2	27	60

ANNEXE D

Parcelle expérimentale de Vernole.

Tableau 10 - Nombre total de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* à Vernole

Dates	<i>P.spumarius</i> infecté	<i>P.spumarius</i> non-infecté	Total
5/05/2017	0	16	16
12/05/2017	0	11	11
20/05/2017	0	8	8
26/05/2017	3	9	12
2/06/2017	0	4	4
9/06/2017	0	0	0
15/06/2017	1	1	2
23/06/2017	0	2	2
Total	4	51	55

Tableau 8 - Nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans les canopées à Vernole

Dates	<i>P.spumarius</i> infecté	<i>P.spumarius</i> non-infecté	Total
20/05/2017	0	5	5
26/05/2017	3	4	7
2/06/2017	0	1	1
9/06/2017	0	0	0
15/06/2017	1	1	2
23/06/2017	0	1	1
Total	4	12	16

Parcelle expérimentale de Squinzano.

Tableau 11 - Nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans le champ expérimental de Squinzano

Dates	<i>P.spumarius</i> infecté	<i>P.spumarius</i> non-infecté	Total
5/05/2017	0	20	20
12/05/2017	0	8	8
20/05/2017	0	3	3
26/05/2017	0	1	1
2/06/2017	0	1	1
9/06/2017	0	0	0
15/06/2017	0	0	0
23/06/2017	0	0	0
Total	0	33	33

Tableau 12 - Nombre de *P.spumarius* infectés et non-infectés par *X.fastidiosa* dans les canopées hors du champ expérimental de Squinzano

Dates	<i>P.spumarius</i> infecté	<i>P.spumarius</i> non-infecté	Total
20/05/2017	0	3	3
26/05/2017	0	1	1
2/06/2017	0	4	4
9/06/2017	0	5	5
15/06/2017	1	8	9
23/06/2017	0	5	5
Total	1	26	27