

Colloque organisé à l'occasion des 20 ans du DSF

20 ans d'expérience – Un défi pour l'avenir

Palais des Congrès de Beaune, 10 et 11 mars 2009

### Quatrième session

## Le nématode du pin et sa dissémination : le point des connaissances

François Lieutier, Bruno Vincent, Fotini Koutroumpa

Université d'Orléans



### I – Introduction

Les deux premières diapositives représentent quelques photos de dégâts au Portugal. L'allure du peuplement forestier est celle d'un peuplement éclairci en vue d'une régénération mais celui de la photo l'a été dans un but sanitaire suite aux dégâts du nématode.

La diapositive 2 présente quelques chiffres empruntés au Portugal et à différents autres pays. Ces chiffres soulignent l'importance de ce problème qui a été détecté pour la première fois au Japon, dans les années 1980.

Ce problème n'est pas encore présent en France, néanmoins, il est important de le prendre en compte dès aujourd'hui pour essayer, comme l'a expliqué Marie Laure LOUSTAU, de prévenir les introductions plutôt que de lutter une fois qu'elles sont installées.

La troisième diapositive présente un autre exemple de peuplement au Portugal, montrant l'étendue des dégâts que l'on observe ainsi à perte de vue dans certaines régions de la forêt portugaise. Les photos ont été prises au sud de Lisbonne, là où a été récemment introduit le nématode du pin.

## II - Quels sont les agents biologiques en cause (diapositive 4):



Nématode du pin

### 1. Le nématode (diapositive 5)

Le nématode (*Bursaphelenchus xylophilus*) est une espèce exotique invasive. Sa taille est inférieure au millimètre. La photo de droite présente quelques détails sur sa morphologie interne.

Ce nématode se reproduit, se nourrit et se développe au dépend de ses arbres hôtes (les pins). Il se nourrit grâce à son stylet (photo de droite) et ce faisant, il détruit et déstructure les tissus. Il est transmis des arbres malades aux arbres sains par des coléoptères longicornes du genre *Monochamus*.

### 2. Le vecteur (diapositive 6)

Les vecteurs sont toujours des insectes du genre *Monochamus*. La photo représente *Monochamus galloprovincialis* qui est actuellement le vecteur en Europe. Il est également le vecteur au Portugal mais sans doute parce qu'il n'y a qu'une seule espèce de *Monochamus* réellement représentée dans ce pays. La photo en bas à droite montre la quantité de nématodes que peut transporter l'insecte. Ces nématodes sont transportés dans les trachées, organes respiratoires de l'insecte: en moyenne 15 000 nématodes par insecte et jusqu'à 230 000. Il suffit donc d'un insecte qui effectue une nutrition de maturation sur un arbre pour contaminer cet arbre puis l'ensemble du peuplement.



Figure 1. *Monochamus galloprovincialis*

*Monochamus galloprovincialis* est le vecteur en Europe mais tous les *Monochamus* peuvent sans doute être concernés par la vection de ce pathogène.

La liste des *Monochamus* reconnus comme vecteurs dans les zones où le nématode est présent est présentée sur la diapositive.

Remarquons que ces vecteurs sont tous des insectes xylophages secondaires, c'est à dire qui attaquent normalement des arbres dépérissants, et sont aussi tous indigènes. L'invasion biologique est donc très particulière puisque le pathogène, introduit par divers moyens, utilise dans sa zone d'introduction un vecteur local.

Il existe des vecteurs potentiels du nématode dans tous les pays d'introduction. Ils sont déjà en place, le nématode utilise les véhicules qu'il trouve sur place.

3. Le cycle biologique de l'insecte et du nématode (diapositive 7 ; Figure 1)

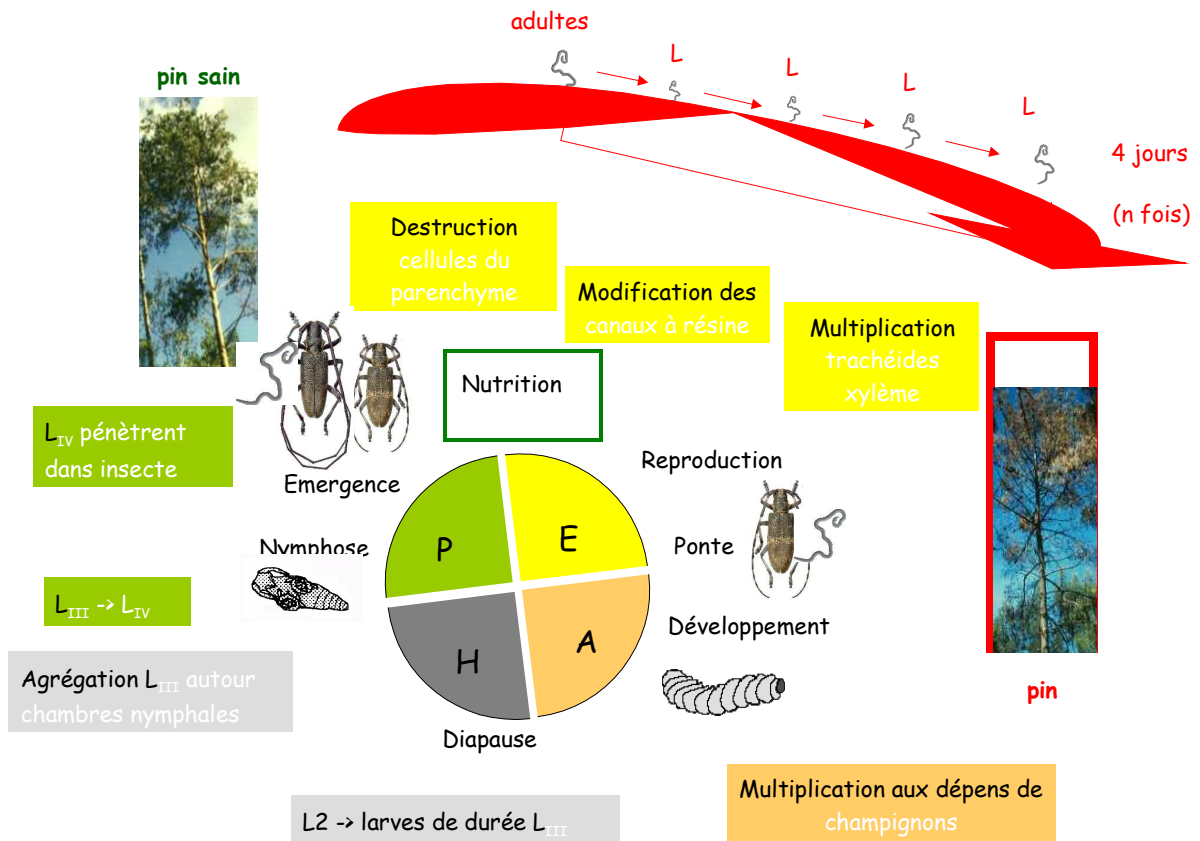


Figure 2.— Le cycle biologique Insecte/Nématode

L'insecte : Après son émergence post nymphale, le jeune *Monochamus* adulte effectue une nutrition de maturation sexuelle sur des pins sains. Là, il ne se reproduit pas et se contente de s'alimenter sur les branches et sur les jeunes aiguilles. Par la suite, il se reproduit (il pond) pendant l'été et au début de l'automne sur les pins affaiblis. Le développement larvaire s'effectue donc de la fin de l'été au printemps. Après une diapause larvaire et la nymphose, l'émergence des insectes a lieu au printemps.

Le nématode : il est introduit par l'insecte dans l'arbre sain au moment de la nutrition de maturation. Le cycle du nématode peut alors s'effectuer de lui même à l'intérieur de l'arbre pendant un grand nombre de générations. Quatre jours suffisent pour une reproduction complète du nématode et les générations peuvent se succéder ainsi dans l'arbre pendant tout le printemps et l'été.

Un certain nombre de dégâts sont alors causés à l'arbre, ce qui l'affaiblit. Cela profite au *Monochamus* puisque sa biologie de xylophage secondaire ne l'autorise à se reproduire que sur les arbres malades ou dépérissants.

Figure 3. Dégâts observés sur pin suite à une attaque par *B.Xylophilus*



Il peut ainsi se reproduire sans problème sur un arbre dans lequel il a lui-même introduit le facteur d'affaiblissement au cours de sa nutrition de maturation. Il existe encore une possibilité de contamination de l'arbre par les nématodes au moment de la reproduction de l'insecte mais elle est extrêmement réduite. La principale contamination se fait au moment de la nutrition de maturation.

Le nématode se développe au dépend d'un certain nombre de champignons, et passe par plusieurs stades larvaires. Au 3<sup>ème</sup> stade, les nématodes se regroupent autour des chambres nymphales de l'insecte où ils muent en un 4<sup>ème</sup> stade larvaire qui pénètrent dans les trachées de l'insecte.

### III - Comment ce problème est-t-il arrivé en Europe et quels sont les risques pour la France ? (diapositive 8 ; Figure 2)

1934/1970 (diapositive 9) : Ce nématode a été décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1934 en Amérique du Nord. Il n'a jamais causé de dégâts sur ce continent par suite de la résistance naturelle des pins, acquise au cours d'une longue co-évolution entre nématode et pins locaux. Il a été introduit au Japon bien avant 1970 mais les dégâts se sont révélés à partir de 1970.



1999 : Par la suite, il a été disséminé dans divers pays asiatiques dont la Chine. Puis en 1999, il a été découvert au Portugal, où l'introduction a sans doute eu lieu peu d'années auparavant. Si l'on sait que l'origine est asiatique, on ne connaît pas le pays à l'origine de l'introduction.

Figure 4. Origine du problème

Entre 1999 et 2008 (diapositive 10) : les dégâts se sont cantonnés au sud de Lisbonne dans la région de Setubal (sans doute le port d'introduction). Les polygones noirs et verts sur la carte représentent les zones de dégâts extrêmement importants. Autour sont représentées des zones de surveillance dans lesquels surviennent quelques dégâts et dans lesquels les arbres sont surveillés de façon extrêmement étroite par les Portugais.

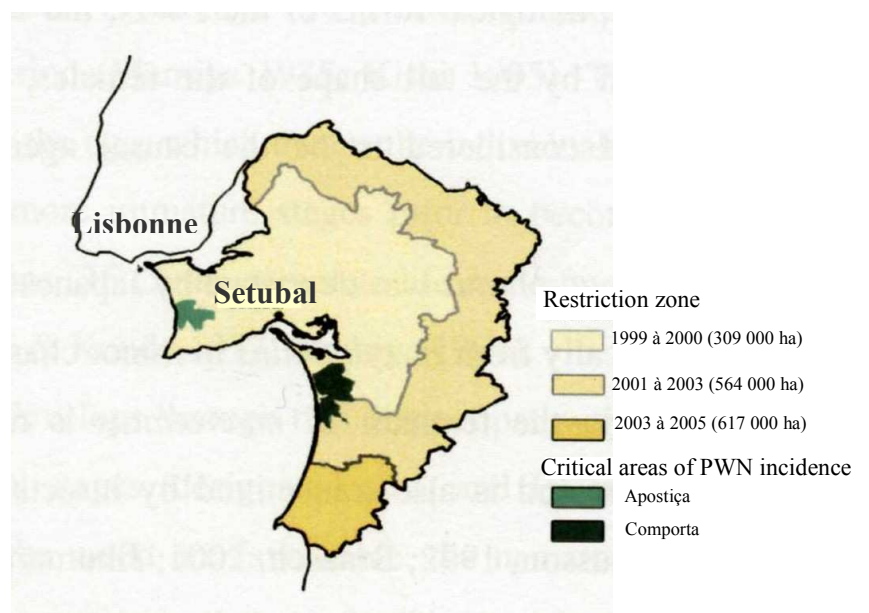


Figure 5. Évolution de l'infestation au Portugal

Jusqu'en 1999, l'infestation était localisée au sud de Lisbonne ce qui était relativement rassurant dans la mesure où le massif forestier concerné était isolé des autres massifs forestiers portugais. L'infestation s'est peu étendue grâce aux activités de surveillance et d'élimination des arbres attaqués par les portugais (Figure 4).

2008 : Malheureusement en 2008, plusieurs foyers nouveaux ont été détectés, dont au moins 2 au nord du Portugal et quelques autres également en Espagne. Les risques pour la France et le reste de l'Europe s'en trouvent considérablement accrus, par suite de la continuité des forêts du nord du Portugal et de l'Espagne, la contamination pour le reste de l'Europe pouvant se faire à travers la France.

Quel sont ses risques ? L'insecte vecteur possédant une capacité de vol non négligeable, on peut imaginer que le nématode sera disséminé naturellement par le *Monochamus* à travers les peuplements de pins et que l'invasion s'étendra ainsi progressivement aux divers peuplements forestiers jusqu'à notre pays. Interviennent également les transports de bois et même les transports accidentels. C'est d'ailleurs sans doute de cette façon et non par infestations naturelles que le nématode a été introduit au Nord du Portugal, sinon il aurait été détecté auparavant dans les zones intermédiaires entre Lisbonne et le Nord du pays. C'est une possibilité d'invasion des forêts françaises par voie terrestre mais on ne peut pas éliminer non plus les possibilités d'une nouvelle introduction de bois dans un certain nombre de ports français.

#### IV – Les travaux de recherche

Si on veut prendre des mesures préventives, il faut d'abord estimer les besoins (diapositive 12)? : ceux-ci correspondent à un certain nombre de questions :

— Quels sont les risques de dissémination du nématode en France, dans l'hypothèse où il serait introduit dans un de nos ports ou franchirait la frontière pyrénéenne ?

— Quelles seraient ses modalités d'extension ? Quelles pourraient être les bases d'une méthode de détection et de surveillance ? Ceci est extrêmement important car, plus on détecte le problème tôt, plus on est à même de prendre des mesures.

Répondre à ces questions implique d'avoir des connaissances :

— sur la biologie des *Monochamus* français (vecteurs potentiels),

— sur les nématodes qui sont naturellement associé aux *Monochamus* français. Nous savons depuis très longtemps qu'il y a un grand nombre de nématode du genre *Bursaphelenchus* qui sont naturellement présents dans les forêts françaises sans qu'ils causent de dégâts. La connaissance de ceux qui sont naturellement associés aux *Monochamus* et de leurs relations avec cet insecte est indispensable, ces nématodes indigènes pouvant éventuellement être un frein à l'extension du pathogène exotique.

— sur les facteurs de dissémination.



1. Résultats des travaux en Europe sur le vecteur et ses nématodes associés (diapositive 14, Figure 5))

a) Vecteurs en France

Des travaux relatifs aux vecteurs ont été menés par l'Université d'Orléans en collaboration avec les correspondants observateurs. Les travaux relatifs aux nématodes, menés également par l'Université d'Orléans, ont nécessité une coopération avec le Portugal (nous ne pouvions en effet pas effectuer les expériences avec le nématode pathogène en France). Nous verrons ensuite un certain nombre de travaux relatifs à la dissémination, effectués par l'INRA d'Orléans avec la collaboration de l'Académie des sciences de Chine.

Il existe trois vecteurs potentiels en France. Les objectifs de l'étude étaient d'approfondir la biologie et l'écologie de ces *Monochamus* dans notre pays puis de connaître la structure de leurs populations, structure intra spécifique (surtout *Monochamus galloprovincialis*) et inter spécifique. (diapositives 16-17-18).

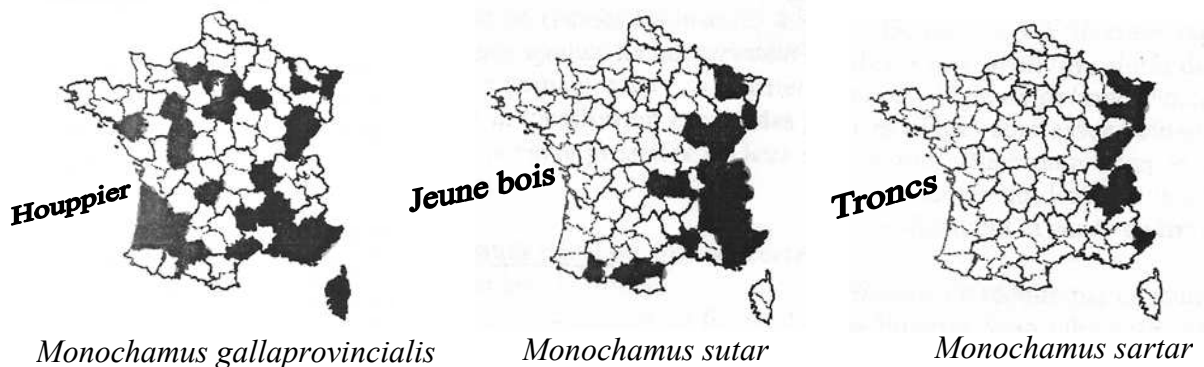


Figure 6. Trois vecteurs de *B.xylophylus* en France

Les résultats ont donné un certain nombre d'informations concernant la longévité et la fécondité. La fécondité est extrêmement élevée. Nous avons montré qu'il existe 4 stades larvaires (une incertitude persistait entre 3 ou 4 stades). Nous avons également montré qu'il existe une diapause au 4<sup>ème</sup> stade larvaire et probablement même une diapause prolongée, seule façon d'expliquer l'existence de telles larves âgées de 2 ans ou même plus (diapositives 19-20-21).

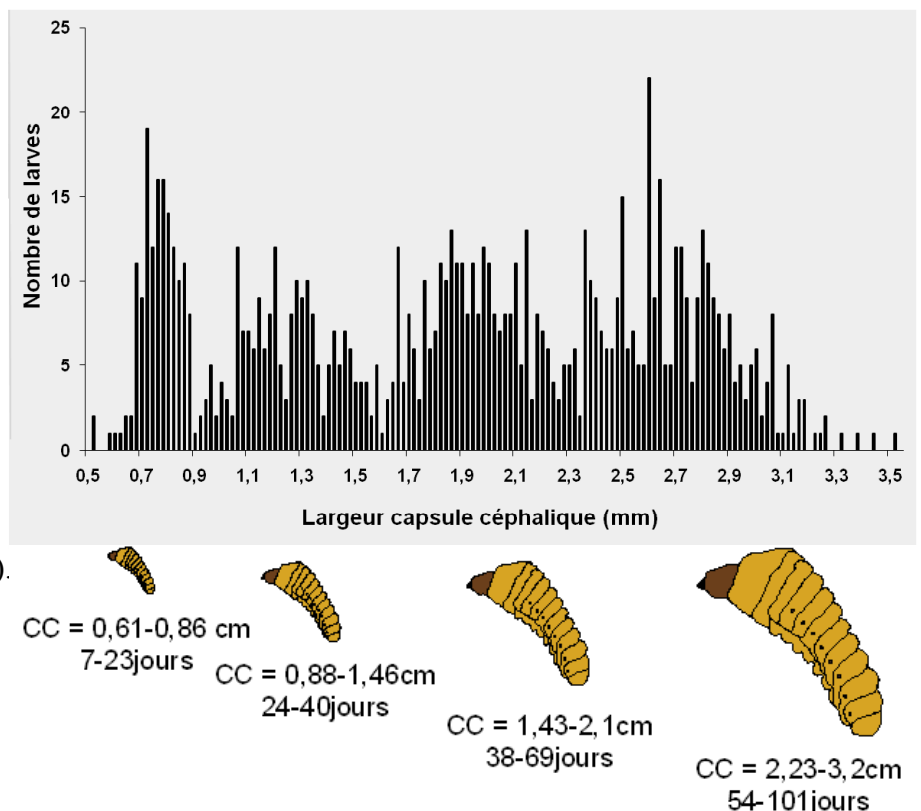
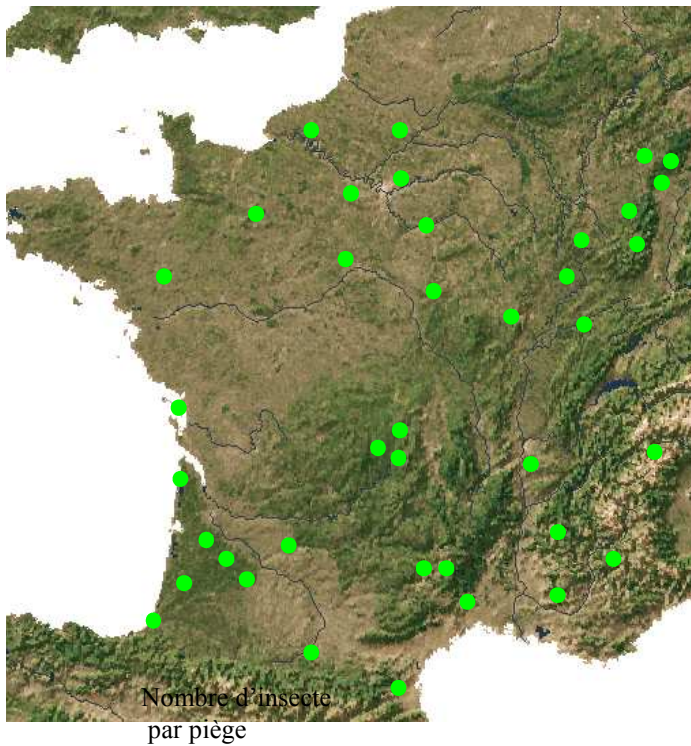
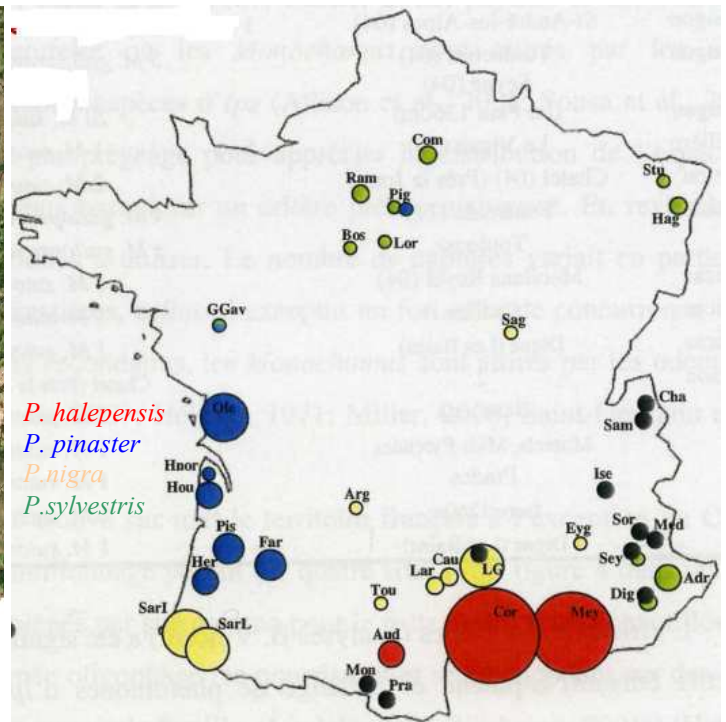


Figure 7. Les 4 stades larvaires de *M.galloprovincialis*

Les captures. Un certain nombre de piégeages (leur disposition sur le terrain est présentée sur la carte) ont été réalisés grâce à la collaboration des correspondants-observateurs. Les captures ont été essentiellement situées dans le sud-ouest et le sud-est de la France, sur pin Maritime et pin d'Alep. Les conditions thermiques des localités influent très certainement sur les captures, de même que l'état sanitaire des peuplements. (diapositives 22-23-24, Figure 7)).



Localité des prélèvements



Distribution par région et espèce hôte

Figure 8. Espèces hôtes de *M.galloprouvencialis* sur les zones de captures

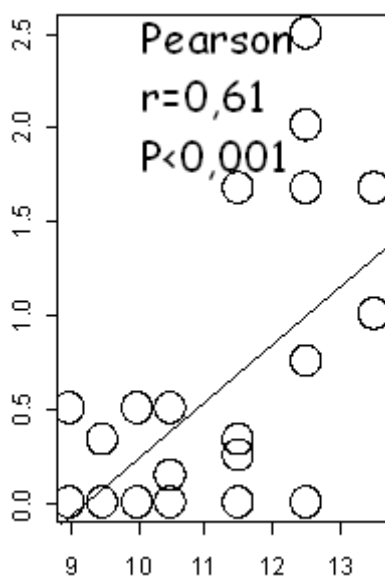


Figure 10. Influence positive de la température sur l'insecte

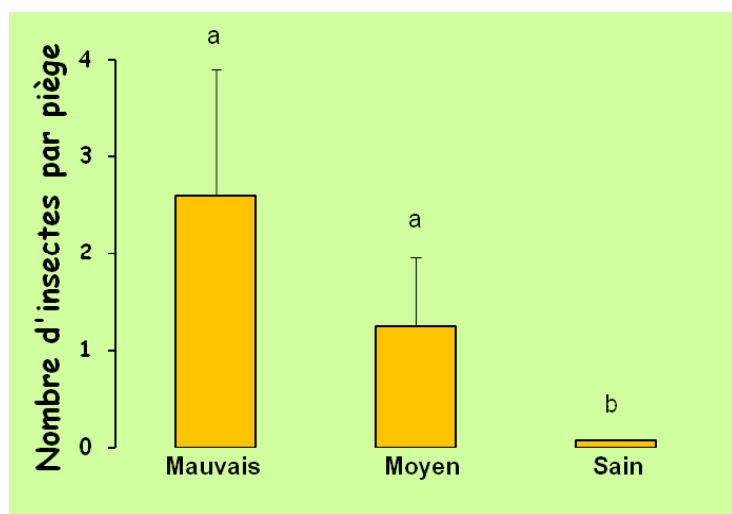


Figure 9. Influence de l'état sanitaire du peuplement (plus d'insectes sont présents lorsqu'il y a plus d'arbres morts, de chablis, d'arbres affaiblis...)

Deux approches ont permis d'appréhender la structure des populations : une approche morphologique et une approche génétique. Nous ne présentons ici que les résultats de l'approche génétique. Nos échantillons répartis sur toute la France ont été complétés par un certain nombre d'échantillons étrangers (diapositive 25).

L'approche génétique a permis de construire des arbres phylogénétiques pour lesquels chaque code correspond à une population de nématode. Les arbres phylogénétiques permettent de mesurer le degré de parenté entre les différentes populations. Dans notre cas, nous pouvons constater une remarquable homogénéité de toutes les populations françaises de *M. galloprovincialis* quelle que soit leur origine. Cela signifie que toutes les populations françaises appartiennent à la même famille (diapositive 26-27, Figure 8).

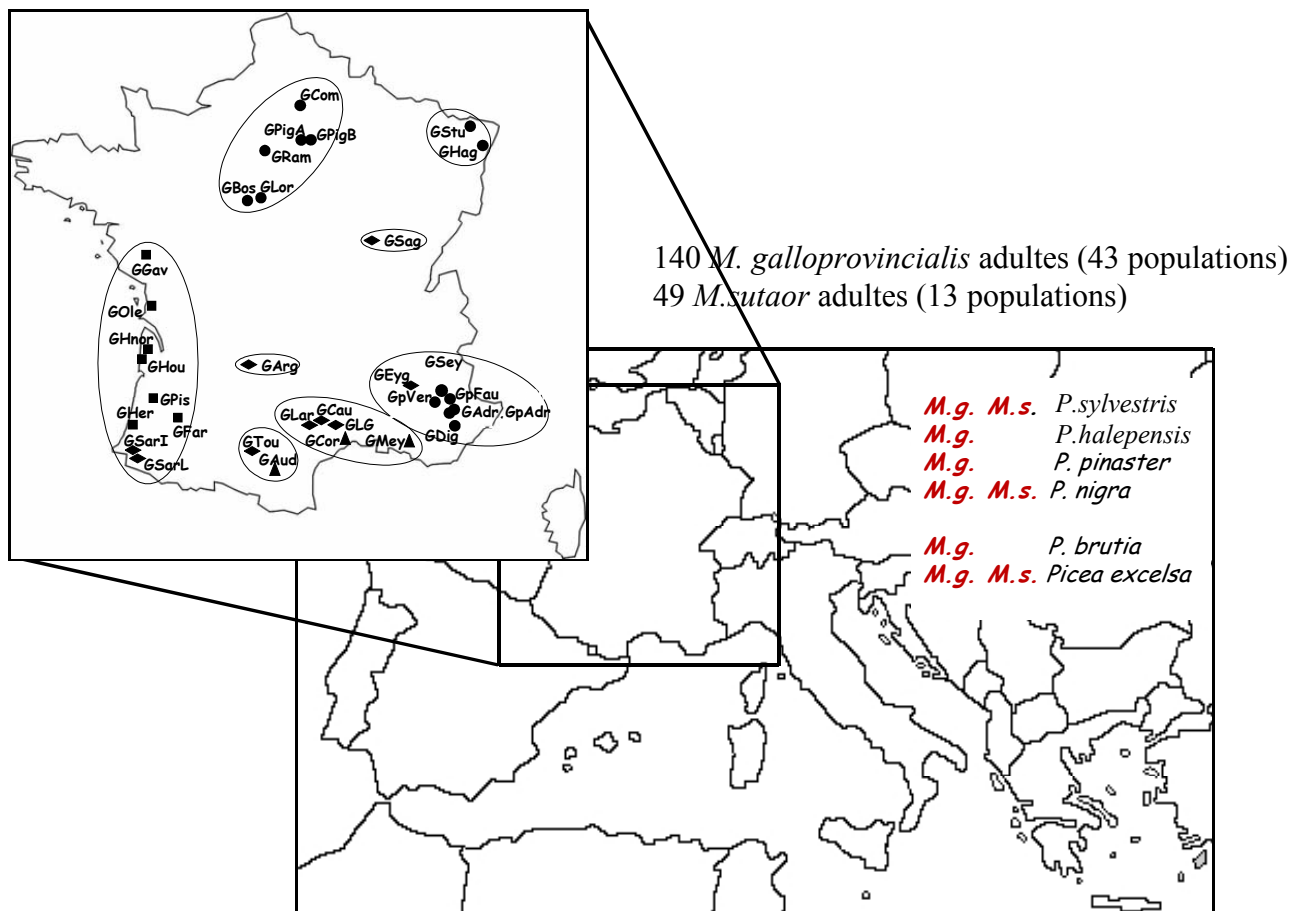


Figure 11. Site d'échantillonnage

Les tests ont aussi montré une variabilité intra population élevée, ce qui signifie que les individus diffèrent entre eux de façon importante à l'intérieur même d'une population. Qu'il n'y ait pas de différence significative d'un point de vue génétique entre populations des différentes localités françaises est peut-être une conséquence de la grande variabilité intra population mais tient sans doute aussi au fait que la nature des arbres hôtes sur lesquels ont été récoltés les insectes avait un faible rôle dans la structuration et que l'insecte possède de bonnes capacités de dispersion (diapositive 28).

Au niveau inter-spécifique, il a clairement été montré par l'étude des arbres phylogénétiques que les populations de *M. galloprovincialis* étaient bien séparés



génétiquement des populations de *Monochamus sutor*. Cette analyse a été effectuée pour répondre à la question d'une potentielle hybridation entre les deux (diapositive 29).

Les principales conclusions des travaux relatifs au vecteur *Monochamus galloprovincialis* sont les suivantes: une fécondité élevée et un grand nombre d'espèces de pins hôtes pour *M. galloprovincialis*, ainsi une sympatrie, c'est-à-dire une même zone de vie, des deux espèces *M. galloprovincialis* et *M. sutor* et (diapositive 30).

Les conclusions des études génétiques et la faible structuration des populations nous permettent de dire qu'il y a en fait des échanges importants entre populations de *Monochamus* en France.

En conclusion, la distribution et la biologie de *M. galloprovincialis* confirment les risques élevés de dissémination du nématode en France s'il y était introduit.

b) Travaux relatifs aux nématodes (diapositive 31)

L'objectif de ces travaux menés également par l'Université d'Orléans était de conclure quant au caractère indigène des nématodes *Bursaphelenchus* en France et au rôle d'obstruction qu'ils pourraient jouer dans l'extension de *B. xylophilus*. Nous avons d'abord cherché à savoir si certaines espèces de ce genre occupaient la même niche écologique que *B. xylophilus*, auquel cas elles pourraient être une barrière à l'extension du nématode (diapositive 32). La carte (diapositive 33) présente les emplacements des différents prélèvements où les nématodes ont été recherchés sur des arbres atteints par *M. galloprovincialis* (arbres pièges). Quatre espèces ont été récoltées dont une extrêmement semblable à *B. xylophilus* et quasiment impossible à distinguer morphologiquement de celui-ci. Cette espèce a été identifiée, heureusement, comme *Bursaphelenchus mucronatus* (diapositive 34, Figure 9).

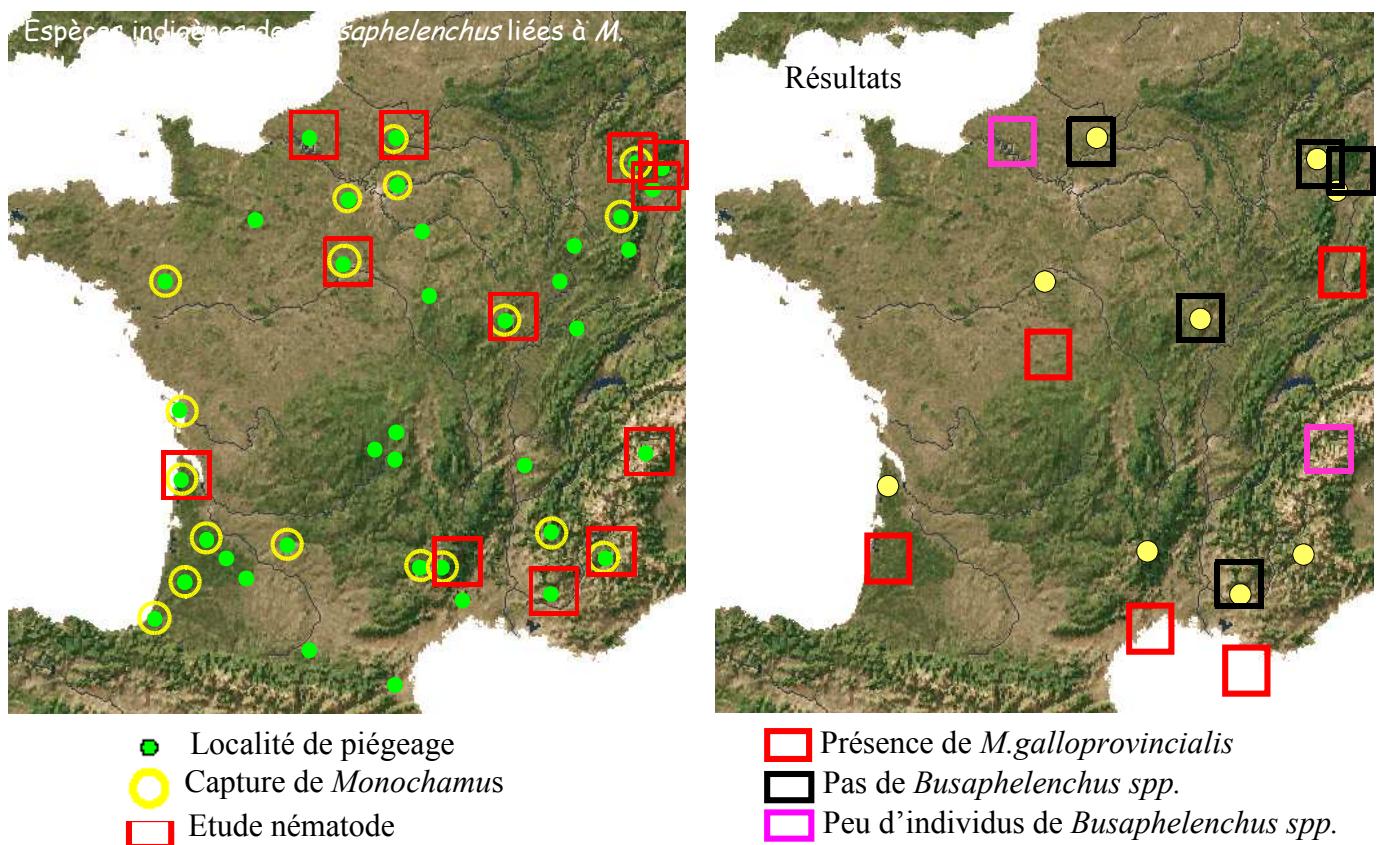


Figure 12. Travaux relatifs au nématode

*B. mucronatus* est le seul nématode trouvé sur les insectes émergents de rondins pièges (diapositive 35). Cette espèce occupe bien la niche écologique de *B. xylophilus* (diapositives 35-36) et pourrait donc éventuellement s'opposer à ou ralentir la dissémination de *B. xylophilus*.

Nous avons alors souhaité tester les relations de compétition entre ces deux espèces. Les expérimentations ont eu lieu au Portugal (INIA Oeiras) car il n'était pas question d'expérimenter en introduisant le *B. xylophilus* dans nos laboratoires. Nous avons comparé une population française de *B. mucronatus* (en vert sur le schéma) et une population portugaise de *B. xylophilus* (en rouge) (diapositive 37, Figure 10). Sur milieu de culture, *B. mucronatus* montre des possibilités de multiplication et un seuil de stabilisation qui peut être supérieur à celui de *B. xylophilus*.

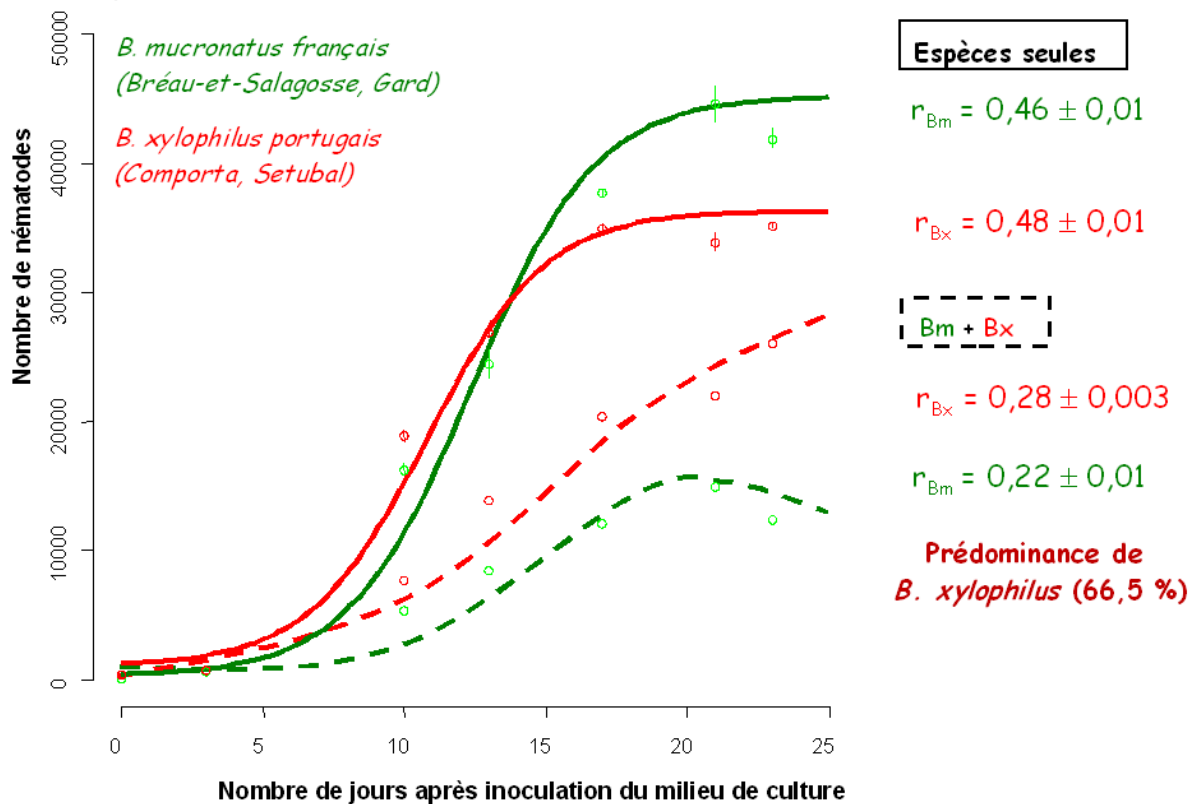


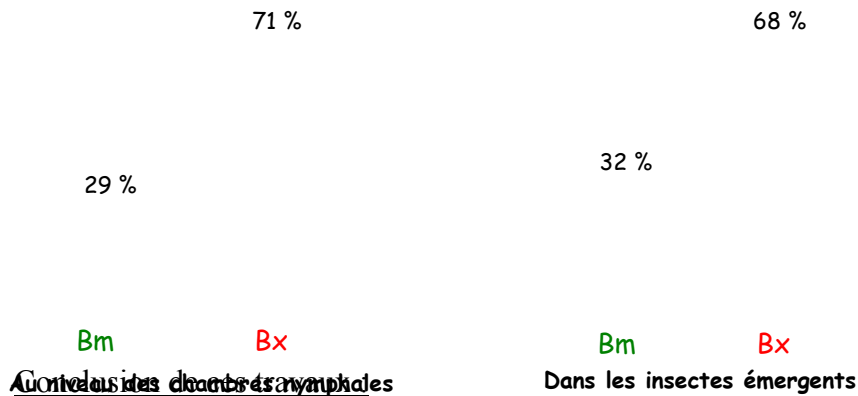
Figure 13. Caractérisation des relations de compétition entre *B. mucronatus* et *B. xylophilus* sur culture de *Botrytis cinerea*

Ce résultat était *a priori* encourageant mais la culture en milieu artificiel des deux espèces ensemble a montré finalement que *B. xylophilus* éliminait *B. mucronatus*.

Le même type d'expérience réalisé sur des rondins d'élevage a permis d'effectuer des observations au niveau des chambres nymphales des insectes et au niveau des insectes eux même. Les résultats montrent que dans les deux cas il y a une prépondérance très nette de *B. xylophilus* sur *B. mucronatus* (diapositive 38, Figure 11).

Importance de chaque espèce dans le cas du double traitement

(rondin inoculé par *B. mucronatus* + *B. xylophilus*)



Avantage compétitif de *B. xylophilus* à la fois dans le rondin et sur l'insecte

Avantage acquis avant la contamination des insectes

Figure 14. Caractérisation des relations de compétition entre *B. mucronatus* et *B. xylophilus* sur rondins, en liaison avec le passage sur les insectes

Enfin, il y a très peu de chance que *B. mucronatus* puisse perturber l'installation et l'extension de *B. xylophilus* en France. Au contraire, *B. mucronatus* pourrait sans doute être déplacé de sa niche écologique par *B. xylophilus*. (diapositive 39)

2. Travaux relatifs aux facteurs de dissémination (diapositive 40)

Ces travaux ont été réalisés par l'INRA Orléans en collaboration avec l'Académie Chinoise des Sciences à Pékin. Le nématode a été introduit en Chine en 1982 dans la région de Nanjing puis dans la région de Hong-Kong en 1988. Il s'en est suivi (diapositive 41, Figure 12) une extension considérable et rapide puisque le nématode est actuellement présent jusqu'à 2000 km des points d'introduction. Toutes les dates d'observations ayant été notées, les conditions étaient très favorables à une étude des modalités de dissémination à différentes échelles :

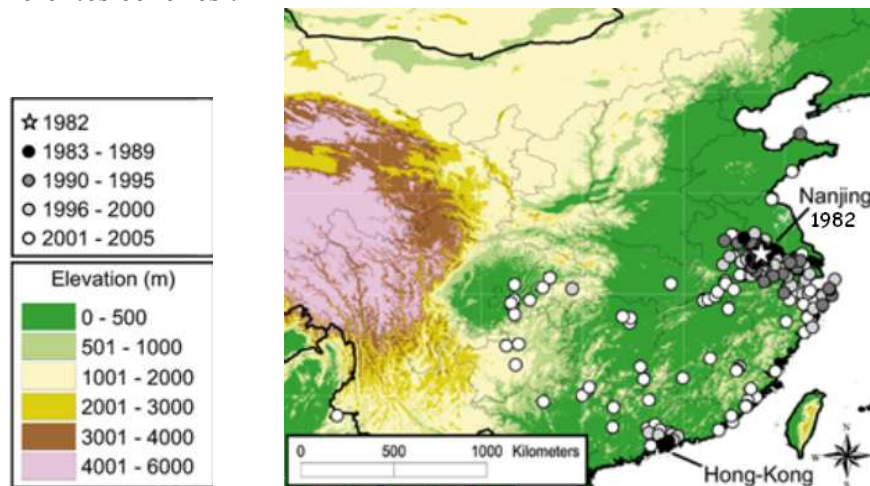
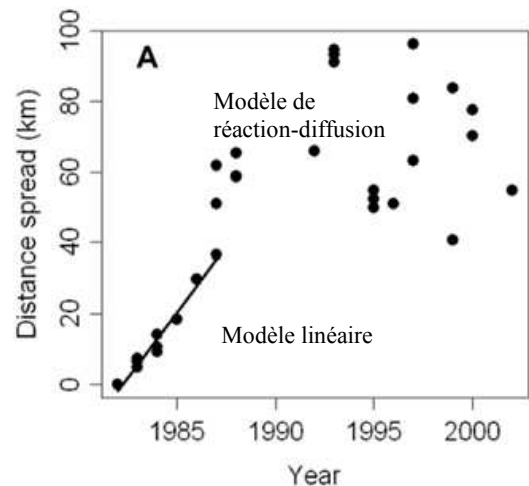


Figure 15 Progression de l'invasion de 1982 à 2005

Modèle de dispersion de courte distance (100 km autour de Nanjing): La combinaison des informations disponibles a conduit à proposer un modèle de dissémination en fonction du temps, d'abord linéaire (pendant 5 à 6 ans) et correspondant à une vitesse d'extension de 7,5 km par an, puis de réaction/diffusion.

Figure 16. Construction d'un modèle de dispersion à courte distance

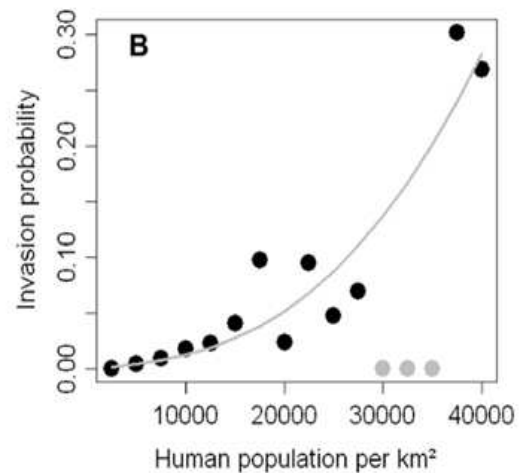
Examen de l'expansion dans un rayon de 100 km autour de Nanjing



Ce modèle de dispersion à deux modalités est tout à fait compatible avec une dissémination naturelle du nématode par *Monochamus* (diapositive 42, Figure 13).

Modèle de dispersion de longue distance : Les points représentant une dispersion à longue distance ont été définis par l'ensemble de ceux qui, l'année de leur contamination se trouvaient à une distance supérieure à 7,5 km des points contaminés les plus proches l'année précédente. Il a ainsi été constaté que plus de 90 % des sites infectés correspondaient à une dispersion à longue distance.

Figure 17. Construction d'un modèle de dispersion à longue distance



Facteurs de la dissémination à grande distance : Il semble que ces facteurs soient très liées aux activités humaines.

Il a été en effet montré un effet très significatif de la présence de voies ferrées, de ports et de lacs à proximité immédiate d'une localité, ainsi qu'un effet de la densité de sa population, sur la probabilité d'invasion de cette localité.

La diapositive montre par exemple une relation extrêmement forte entre la probabilité d'invasion et la densité de population (diapositive 43, Figure 14).

La combinaison de l'ensemble de ces informations et des deux modèles « courte et longue distance » a ensuite permis d'effectuer des prédictions de la présence du nématode dans les différentes régions de Chine.

Ce modèle de prédiction, testé à partir d'une situation connue (celle de 2005), a montré une erreur de seulement 13%. Il a donc ensuite été appliqué à la probabilité d'invasion en 2025. Les résultats sont présentés en rouge sur la carte. Deux hypothèses ont été posées : la carte de gauche correspond à une situation climatique stable et correspondant aux références climatiques de 1950-1980 ; la carte de droite correspond à une hypothèse d'augmentation des températures de 0,3°C par an.

Les résultats montrent peu de différence entre eux. Une extension de l'invasion par le nématode d'environ 50 % en 2025 est prédite.

Il est intéressant de comparer cela à la zone climatique favorable au nématode. Le rouge foncé correspond à la zone climatique favorable sans modification du climat. Le rose correspond à la zone climatique favorable avec modification du climat. On peut constater que la prédiction d'invasion concerne pratiquement toute la zone favorable sans modification du climat (diapositive 44, Figure 15).



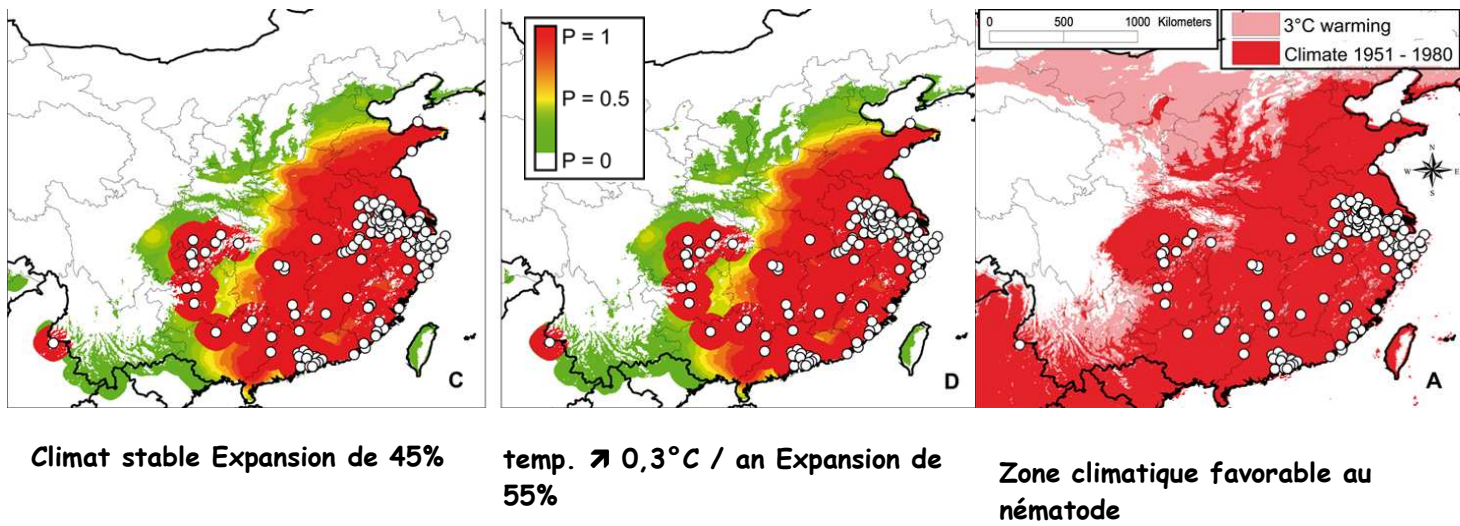


Figure 18. Combinaison des modèles de dispersion à courte et longue

### V - Conclusion :

#### Comment s'orientent les recherches actuellement ?

Il serait intéressant d'utiliser ce qui a été fait en Chine, pour tenter de prédire l'expansion du nématode en France et en Europe, en supposant que le paramètre humain est effectivement prépondérant à grande distance.

Une autre perspective de recherche, également très intéressante, est la construction d'une méthode de détection et de surveillance du nématode, basée sur le piégeage odorant des insectes vecteurs.

Les deux approches sont nécessaires pour une prévention et un contrôle (diapositive 45).