

# Les principales méthodes de détection des bioagresseurs de quarantaine

**Une identification parfois simple à mettre en œuvre**



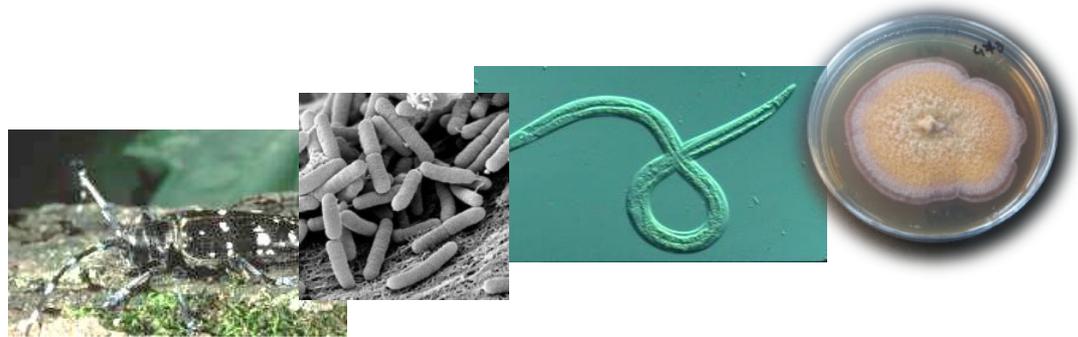
**Mais nécessite aussi parfois un œil de spécialiste**



# Les bioagresseurs de quarantaine

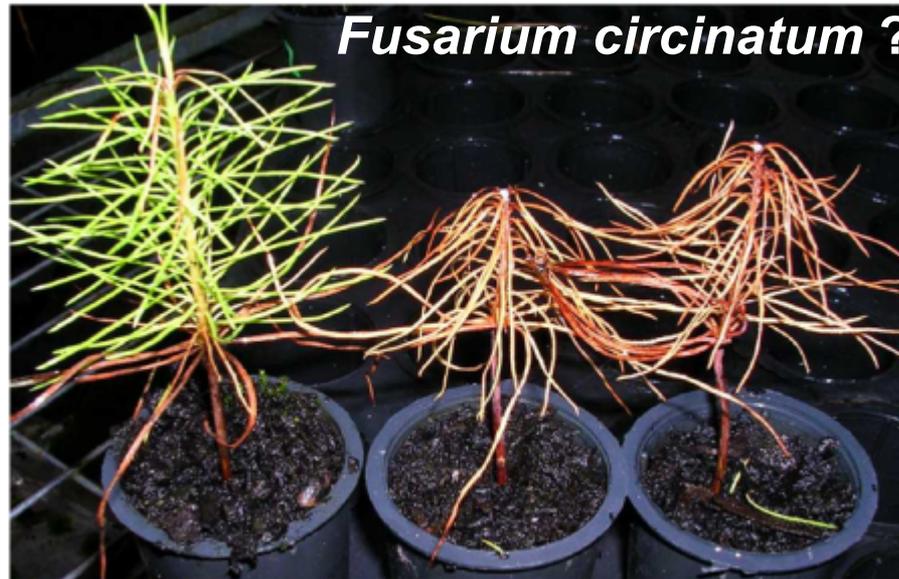
La Directive Européenne 2000-29-CE :

- liste les **organismes de quarantaine interdits** (élaborée à partir d'ARP)
- liste les **végétaux et produits végétaux à risque** et les mesures correspondantes
- Complétée par les **listes A1, A2 de l'EPPO**



- Il existe un contrôle à l'import, à l'export, et un contrôle sanitaire intérieur par les services officiels phytosanitaires.
- Ces contrôles s'appuient sur des analyses officielles de labo. de l'Anses ou de labos agréés.

## Deux types d'approches possibles



↓

Détection  
d'un bioagresseur  
avec *a priori*  
Présence (+)  
Absence (-)

Rapide, sensible, ciblé

↓

Identification de bioagresseurs  
par des techniques d'inventaire  
**±exhaustif**  
Présence (+)  
Absence (-)

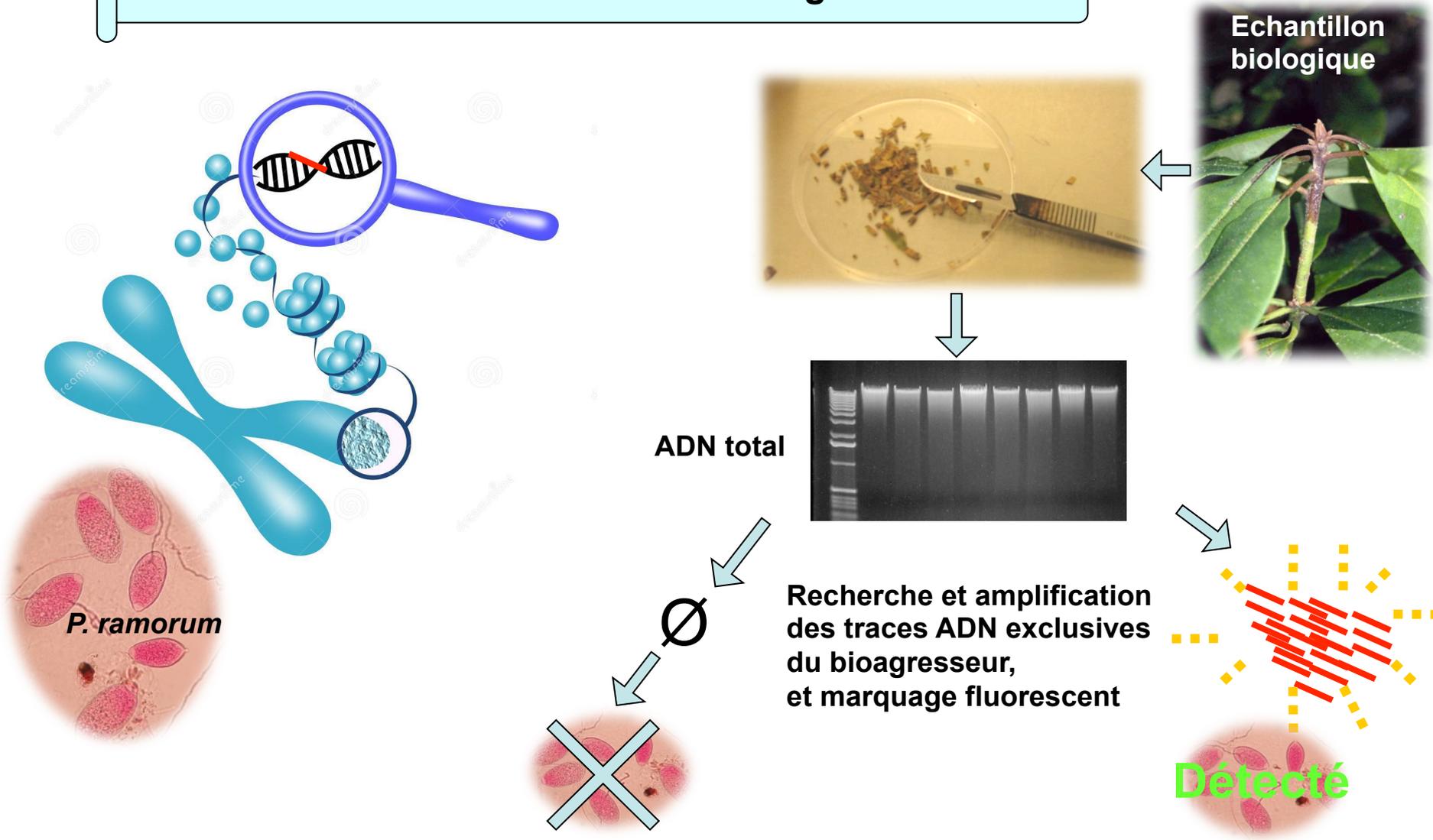
Moins rapide, non ciblé

---

# Techniques moléculaires de détection spécifique

# Détection spécifique par test génétique

Principe : détecter dans un mélange complexe des traces ADN exclusives d'un bioagresseur : 



Echantillon biologique

ADN total

Recherche et amplification des traces ADN exclusives du bioagresseur, et marquage fluorescent

Détecté

*P. ramorum*

# Développement de tests spécifiques

- 1 - Définir avec précision quel est le bioagresseur cible ...
- 2 - recherche de régions génomiques exclusives du bioagresseur

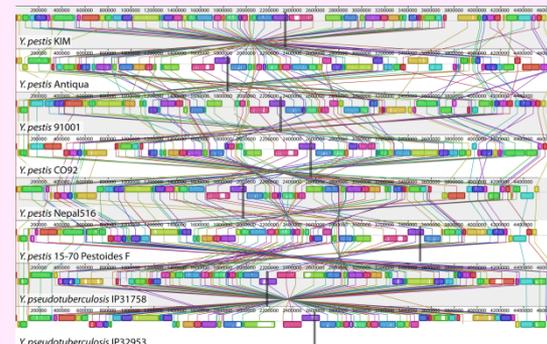
## Recherche ciblée ou aléatoire :

- Gènes d'utilité phylogénétique (gènes de ménage, ADNr, ADNmt, etc.)
- Gènes liés à la pathogénicité
- Utilisation d'empreintes génétiques (Microsat, SCAR)
- Génomique comparative et recherche de motifs exclusifs

```
5' Sequences 3' Sequences
CCACGACTCCAAGTGCACCCGGAT//TGCACATCCACTGGTGGTGCC Wnt1
ACAGAGTGCACAGTGCACCCGGGT//TGTAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt2
GGTGGAAATGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt4
TGTGGCTGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGGT Wnt5a
CACCGAGTGCACAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGG Wnt6
GCTGGAAATGCAAGTGCACCCGGGT//TGTAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt7a
GCTGGAGTGCACAGTGCACCCGGGT//TGCAAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt7b
AAGGACATGCAAAATGTCATGGCAT//TGCAAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt8a
ACGCACGTGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGG Wnt8b
GACCACTGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGG Wnt9a
GACCACTGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGG Wnt9b
GCGGAAATGCAAGTGCACCCGGGT//TGCAGTTCACACTGGTGGTGG Wnt10b
AATGAAGTCAAGTGCACCCGGGT//TGTAAATTCACACTGGTGGTGG Wnt11

UPPER PRIMER LOWER PRIMER
5'-GGGGAATTCANCGAATSYAARTGYCAI-3' 3'-KNSCRBTGGTGGTGCAGATCTTT-5'
EcoRI BglII

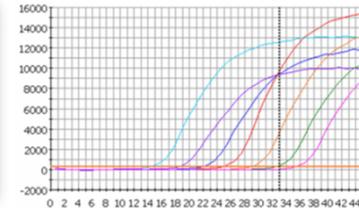
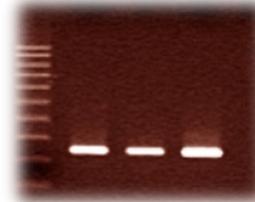
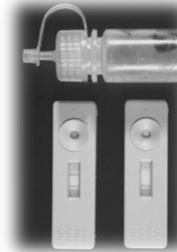
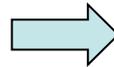
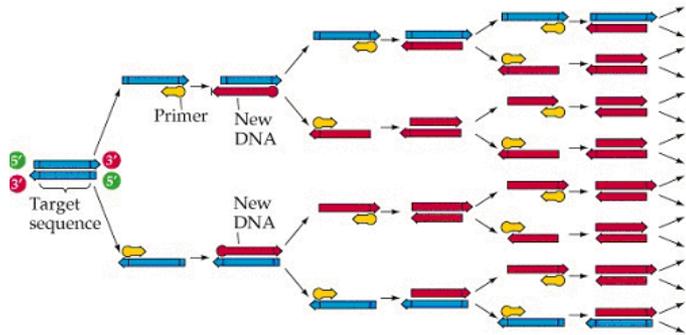
V=ACG, N=ACGT, R=AG, M=AC, Y=CT, H=ACT, W=AT, S=CG, K=TG, B=CGT
```



- 3 - Vérifier initialement, puis en continu, le caractère exclusif, la spécificité des marqueurs retenus

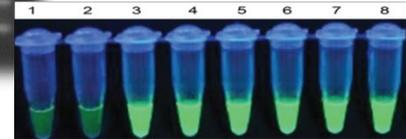
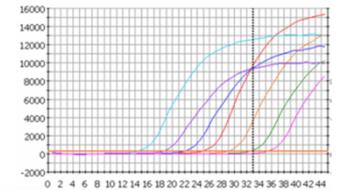
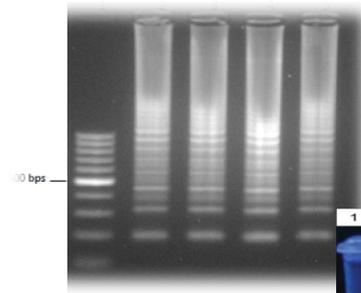
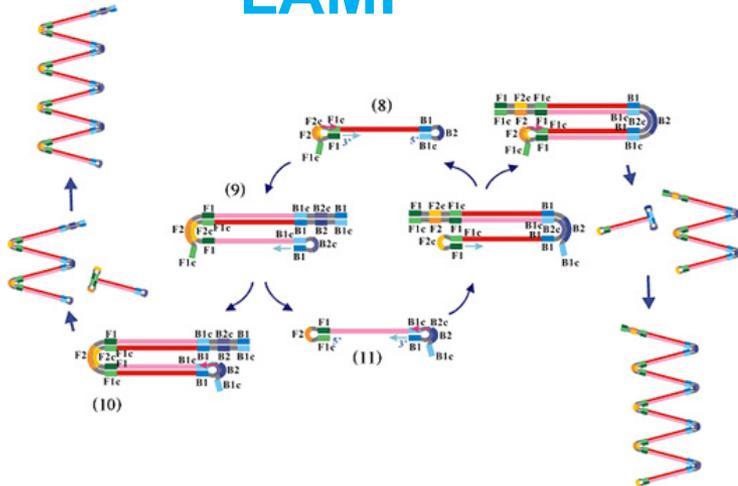
# Les principales techniques moléculaires de détection disponibles

## PCR, PCR temps réel



EMA/PMA

## LAMP



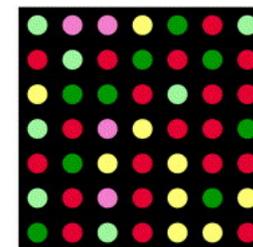
# Les tests de détection sont nombreux et standardisables



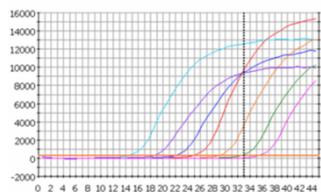
Protocoles internationaux



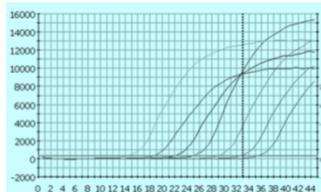
Puce à ADN



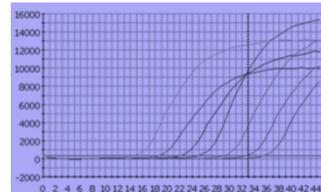
Tests *X. fastidiosa*



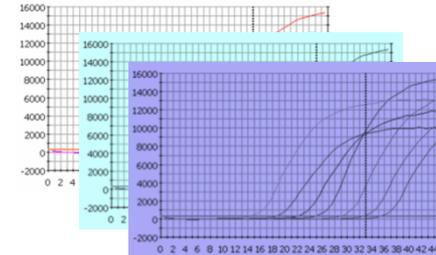
Tests *P. ramorum*



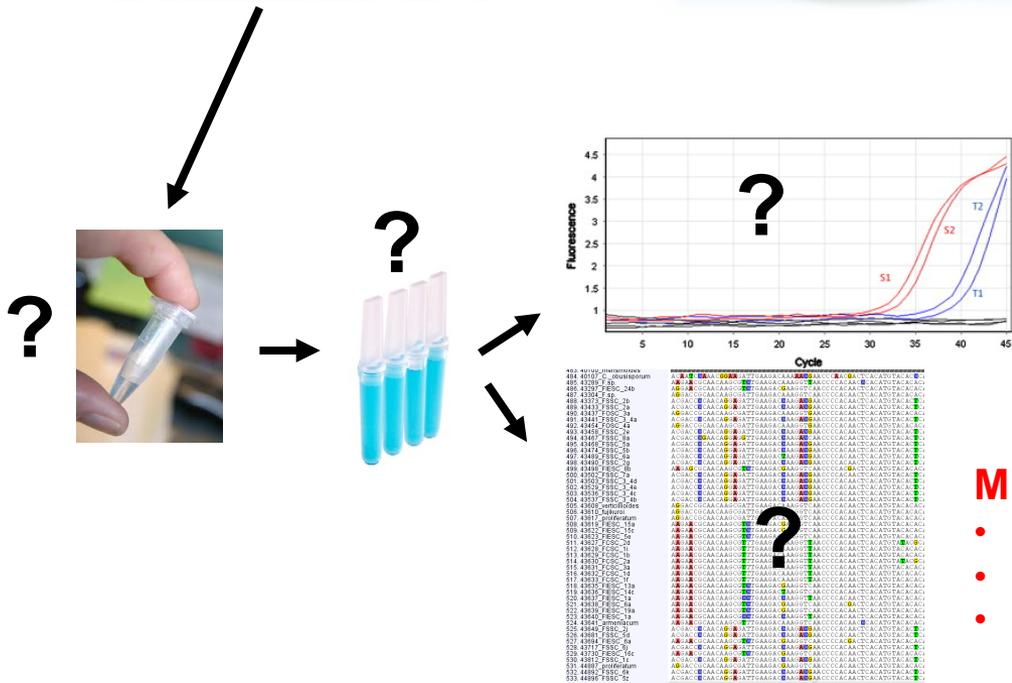
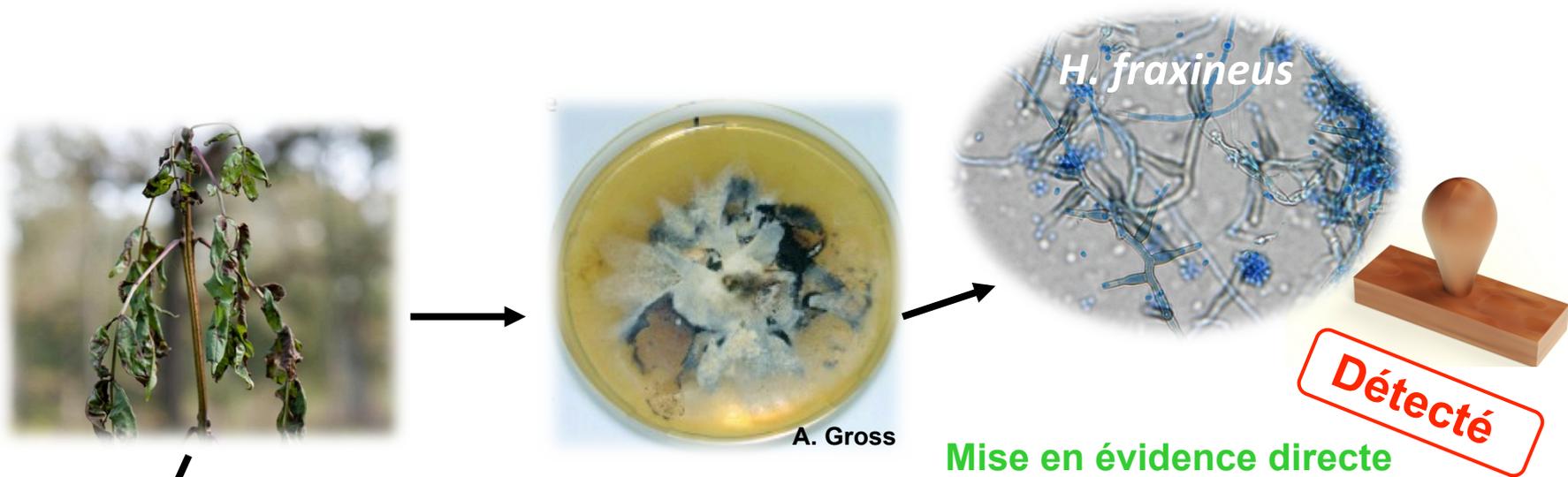
Tests *F. circinatum*



Tests multiplex



# Nécessaire validation d'une méthode / d'une analyse



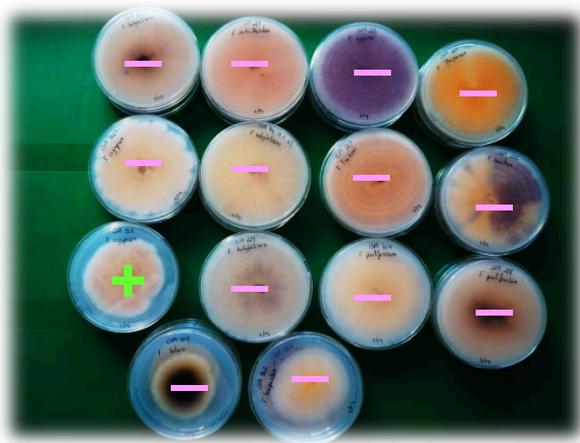
## Mise en évidence indirecte

- Pas de distinction cellules mortes / vivantes
- Problèmes de spécificité
- Problèmes de contaminations

→ ASSURER LA FIABILITE DES RESULTATS

# Éléments clefs d'une validation d'un test de détection

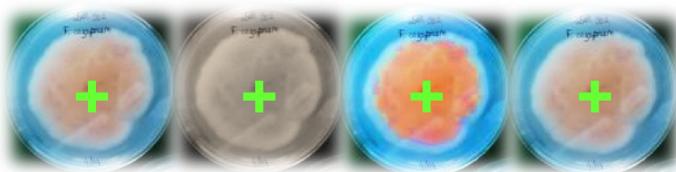
**Spécifique**



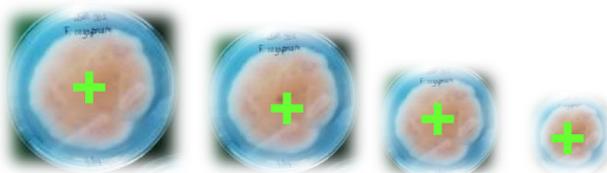
**Bioagresseur cible**



**Inclusif**

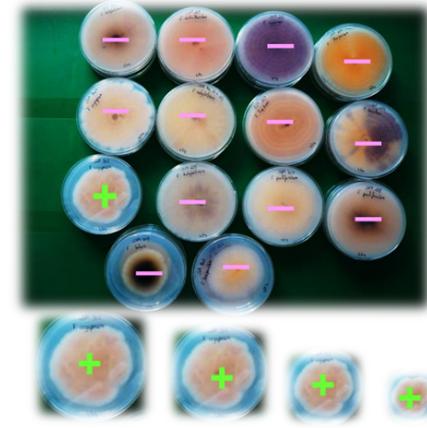
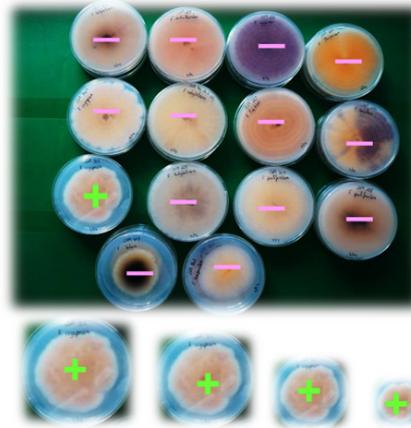


**Sensible**

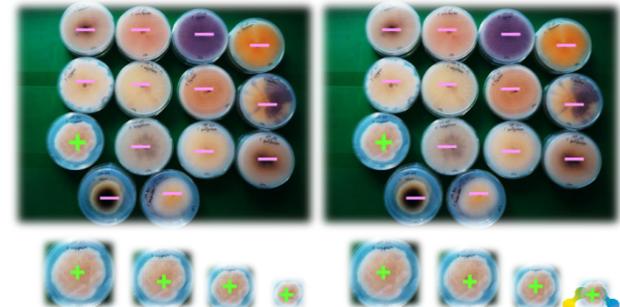
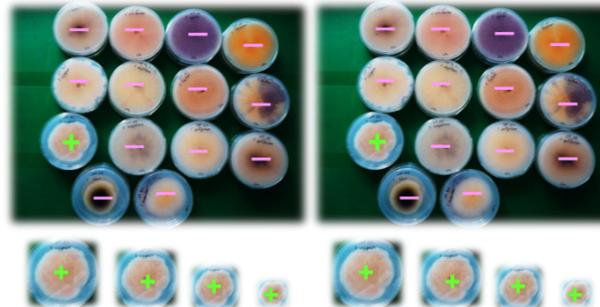


# Éléments clefs d'une validation d'un test de détection

**Répétable /  
reproductible**



**Robuste aux  
variations de  
conditions  
d'utilisation**



# Publication des protocoles optimisés, caractérisés, et validés



## Optimization of a real-time PCR assay for the detection of the quarantine pathogen *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*

Anne-Laure BOUTIGNY<sup>a,\*</sup>, Cécile GUINET<sup>a</sup>, Agathe VIALLE<sup>b</sup>, Richard C. HAMELIN<sup>b</sup>, Axelle ANDRIEUX<sup>c,d</sup>, Pascal FREY<sup>c,d</sup>, Claude HUSSON<sup>c,d</sup>, Renaud IOOS<sup>a</sup>

Eur J Plant Pathol  
DOI 10.1007/s10658-016-0909-7



## A robust and specific real-time PCR tool for the detection of *Phytophthora lateralis* in plant tissues

Nathalie Schenck • Celine Fourrier-Jeandel • Renaud Ioos



Techniques

## Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry

Renaud Ioos, Céline Fourrier, Gabriela Iancu, and Thomas R. Gordon



Techniques

## Development, Comparison, and Validation of Real-Time and Conventional PCR Tools for the Detection of the Fungal Pathogens Causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of Pine

Renaud Ioos, Bénédicte Fabre, Carole Saurat, Céline Fourrier, Pascal Frey, and Benoît Marçais



RESEARCH ARTICLE

## Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4

Jaime Aguayo<sup>1,\*</sup>, Diane Mostert<sup>2,c</sup>, Céline Fourrier-Jeandel<sup>1,c</sup>, Isabelle Cerf-Wendling<sup>1</sup>, Bruno Hostachy<sup>3</sup>, Altus Viljoen<sup>2</sup>, Renaud Ioos<sup>1</sup>



Techniques

## An Optimized Duplex Real-Time PCR Tool for Sensitive Detection of the Quarantine Oomycete *Plasmopara halstedii* in Sunflower Seeds

Renaud Ioos, Céline Fourrier, Véronique Wilson, Kathryn Webb, Jean-Luc Schereffer, and Denis Tourvieille de Labrouhe

---

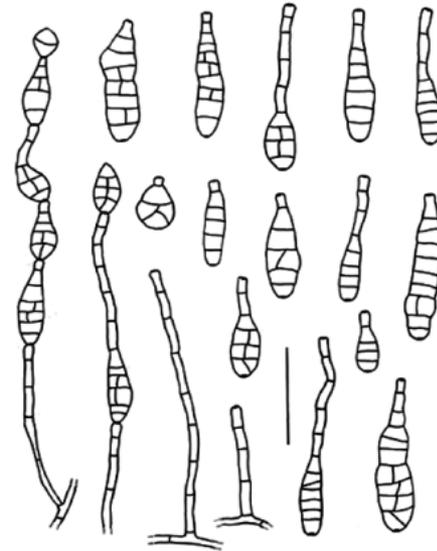
## Techniques d'identifications non spécifiques

# Identification par caractérisation morphologique



Observation

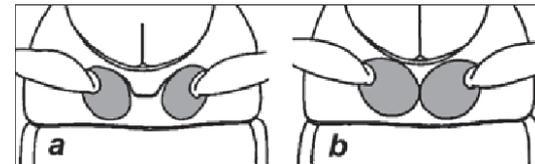
≠  
?  
=



Description  
littérature



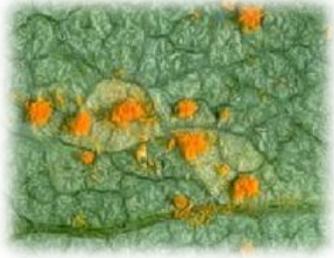
≠  
?  
=



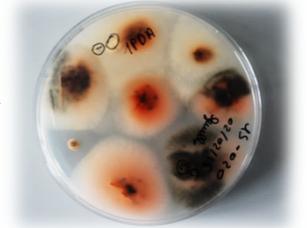
L.M. Nageleisen

# Identification par observation directe de structures des champignons

Observation directe *in situ*



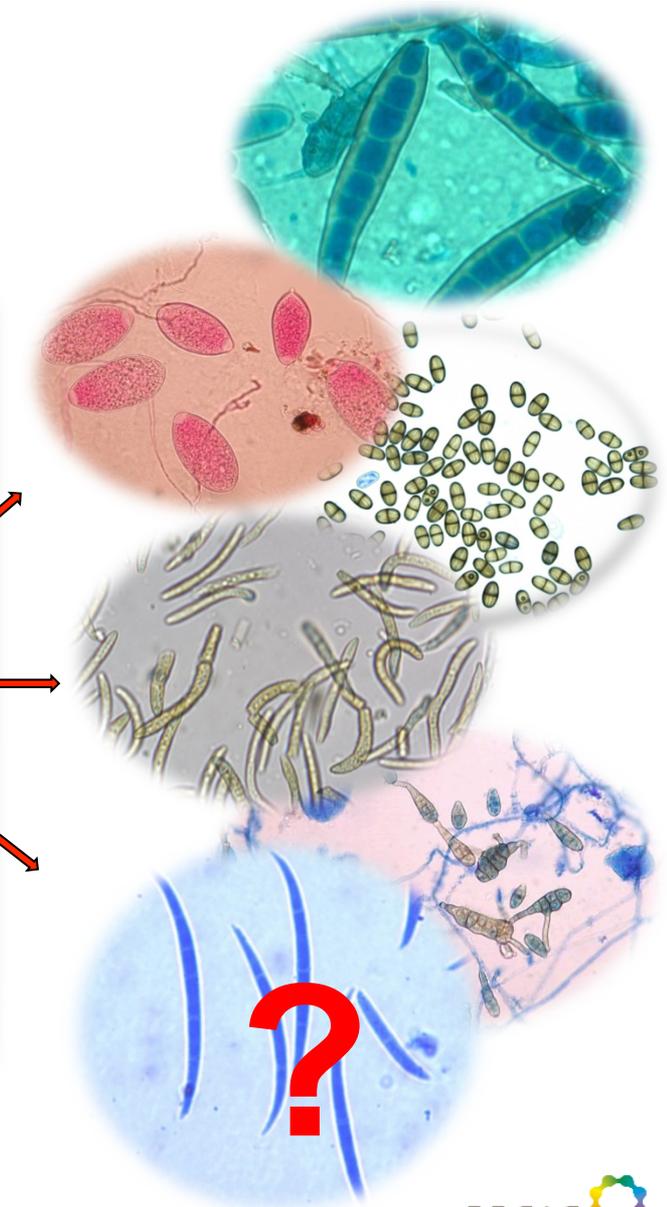
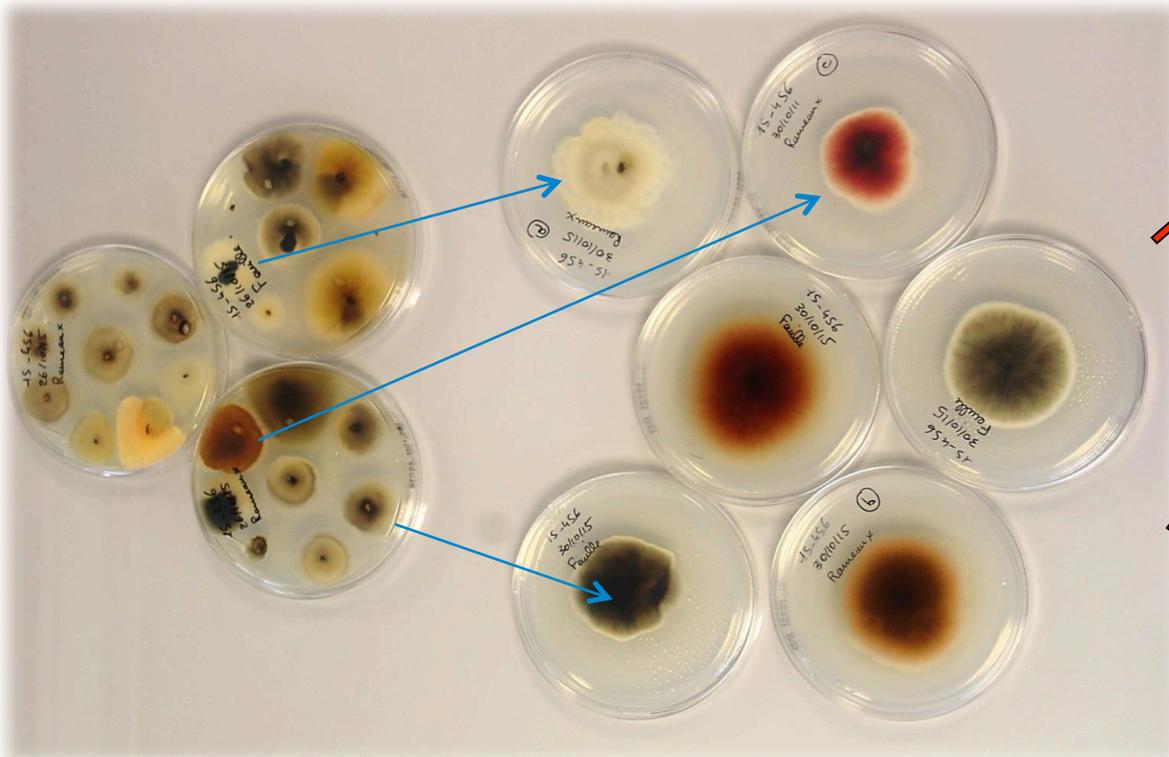
après incubation  
en chambre humide



Après isolement direct

Après piégeage biologique

# Identification suite à isolement en cultures pures



**+ Purification des souches puis observation**

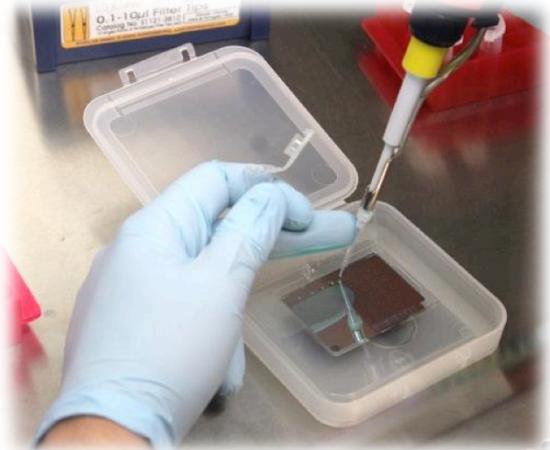
**Techniques d'identification plus fines  
par analyse du protéome (MALDI-TOF)  
et du génome (barcoding et métabarcoding)**

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF : quelques minutes pour identifier

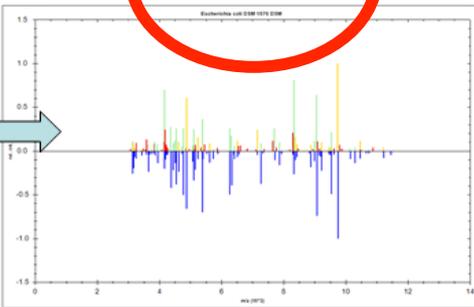
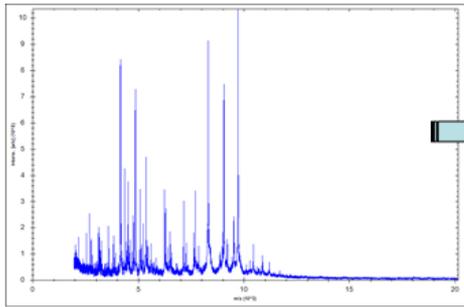


1- prélèvement de cellules

2- Simple extraction protéique et dépôt de l'extrait + matrice sur plaque 96 puits



Base de données

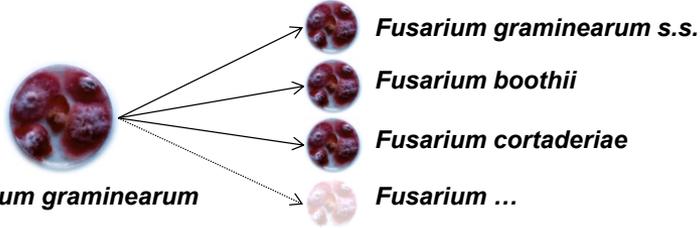


M <sub>0</sub>	Detected Species	Log(Score)
824	F.cortaderiae	2.530
LSVM802		2.052
831	F.aerfachi	2.052
LSVM803		1.948
	F.nepalense	1.901
844	F.nepalense	1.901
	F.brasilicum	1.883
840	F.brasilicum	1.883
841	F.meridionale	1.878
LSVM804		1.794

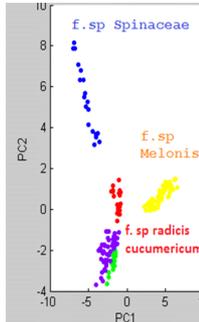
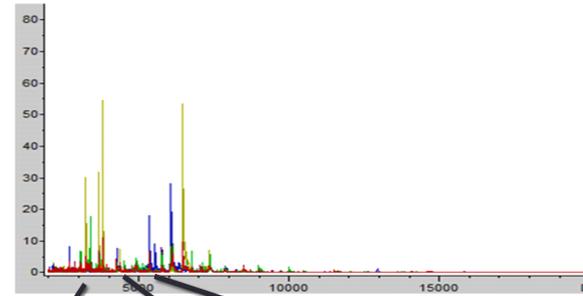
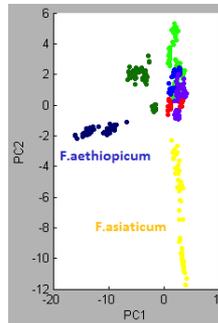
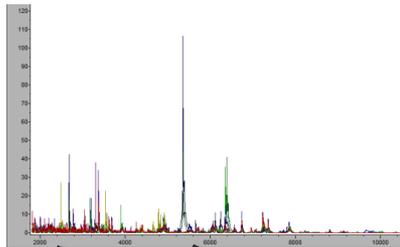
4- Identification par comparaison du spectre à la base de spectres de référence

3- Analyse des échantillons : pulvérisation/ionisation par laser, séparation/détection par masse/charge

# Apports potentiels de l'analyse par MALDI-TOF

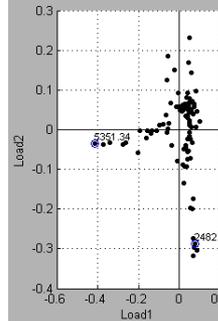


*Formae speciales de F. oxysporum*



*F. boothii*

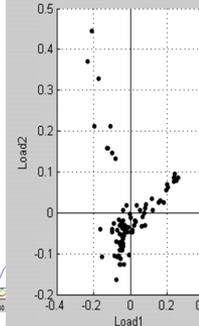
*F. asiaticum*



*Forl*

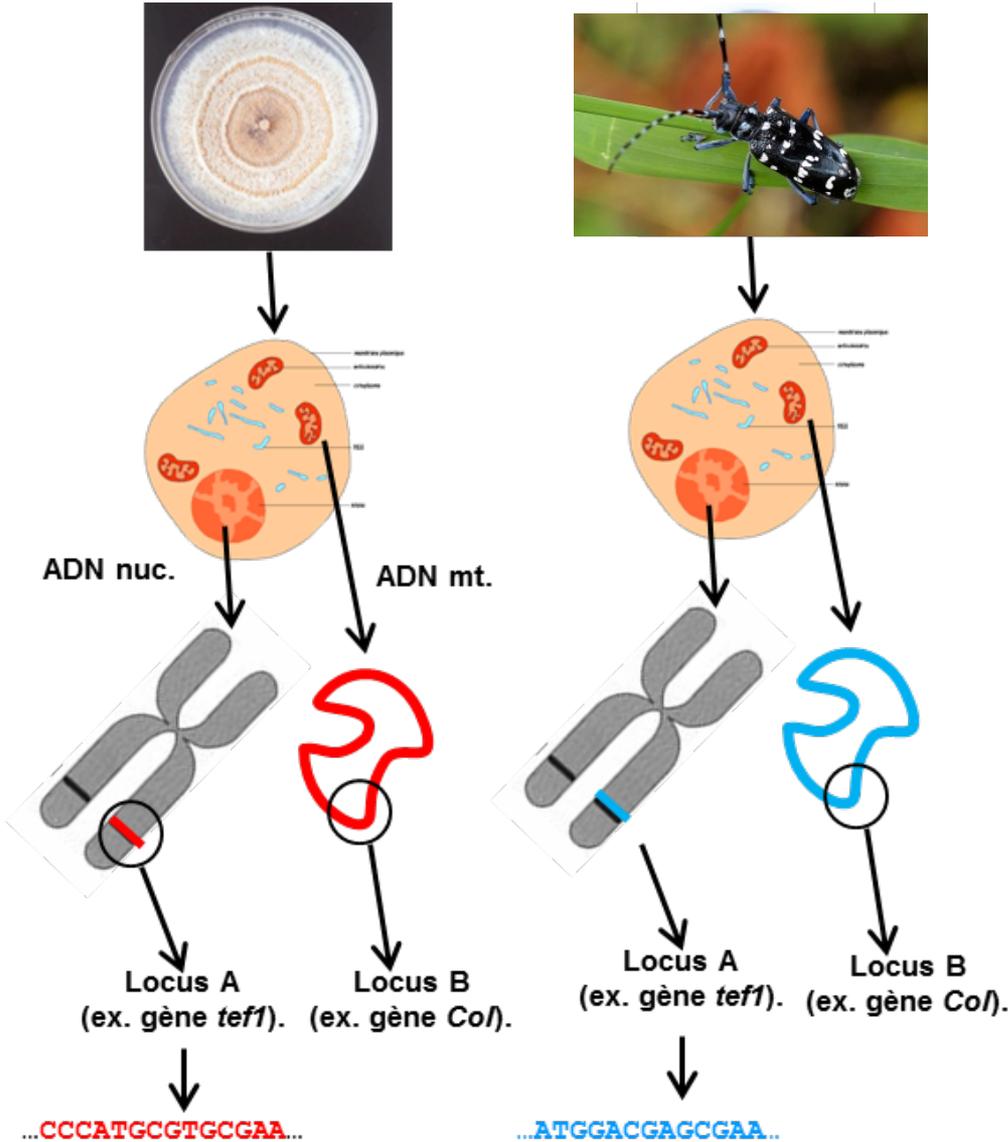
*Fom*

*Fol*



Présence de pics « privés », discriminants

# Analyse de code(s)-barre(s) génétique(s)



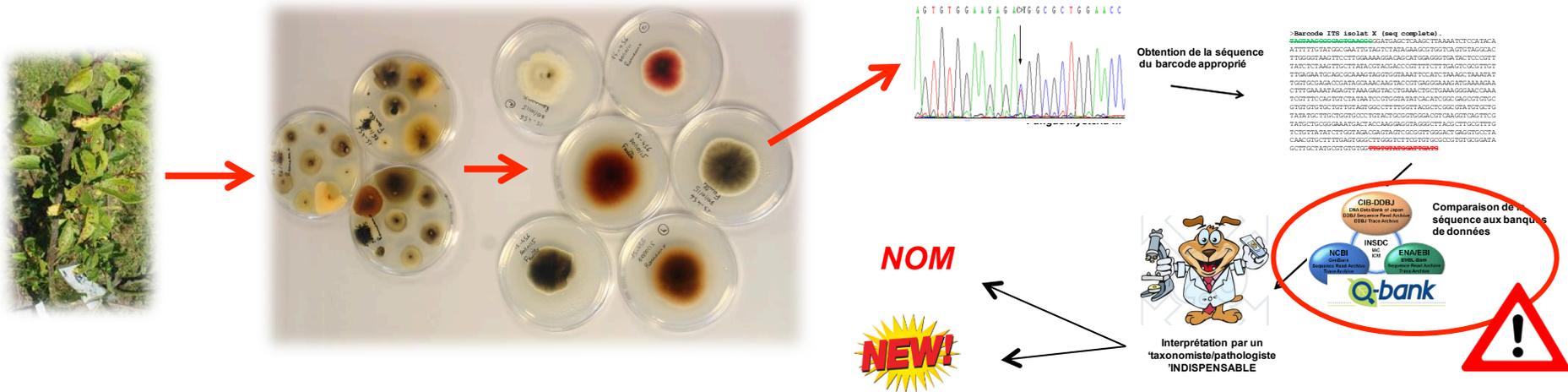
= Outil de taxonomie moléculaire

1. **Standardisé** (même région ADN pour différents groupes taxo)
2. **Monomorphe dans l'espèce**
3. **Polymorphe entre espèces**
4. **Consensuel – Données abondantes dans les BDD.**



# Identification de souches par analyse de code(s)-barre(s) génétique(s)

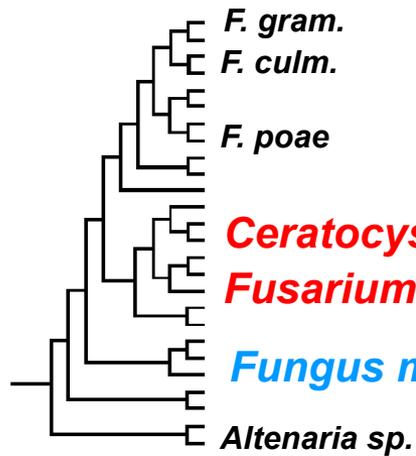
## Approche par séquençage « classique »



Isolement puis identification individuelle par barcoding



# Intérêts du séquençage haut débit



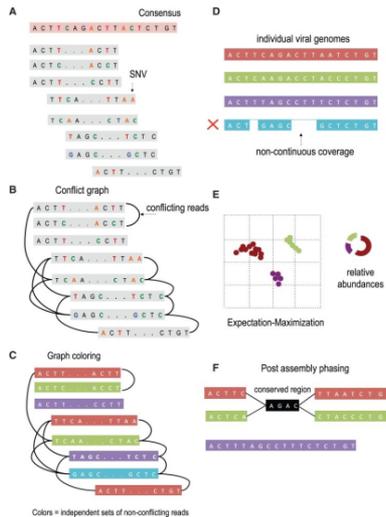
→ Mise en évidence d'un ou plusieurs parasites de quarantaine ou émergents

→ Mise en évidence de taxa inconnus... **NEW!**

→ Détecte des parasites non cultivables

METAbarcoding

**Prospectif / très compliqué à valider...**



→ Mise en évidence d'un ou plusieurs virus de quarantaine ou émergents

→ Mise en évidence de virus inconnus... **NEW!**

Assemblage de génome

# Quelles évolutions pour les tests de détection ?

- La réglementation de quarantaine (UE + OEPP) liste des noms, ...parfois assortis de « pathogènes sur... » ou « non européens »
- Un « nom » ou un « barre-code » ne renseigne pas toujours sur l'agressivité, le potentiel invasif, le comportement futur du bio-agresseur...
- D'autres paramètres que l'identité taxonomique sont des pistes à explorer dans le futur :
  - Gènes liés à la pathogénicité (McTaggart et al., 2016)
  - Traits biologiques liés au potentiel invasif (Philibert et al., 2011)
  - Viabilité de l'agent pathogène



*formae speciales* ou races chez *Fusarium*,

*Alternaria*

*Magnaporthe*