A

ISSN 0032-4154 1 7 €

POMME DE TERRE FRANÇAISE

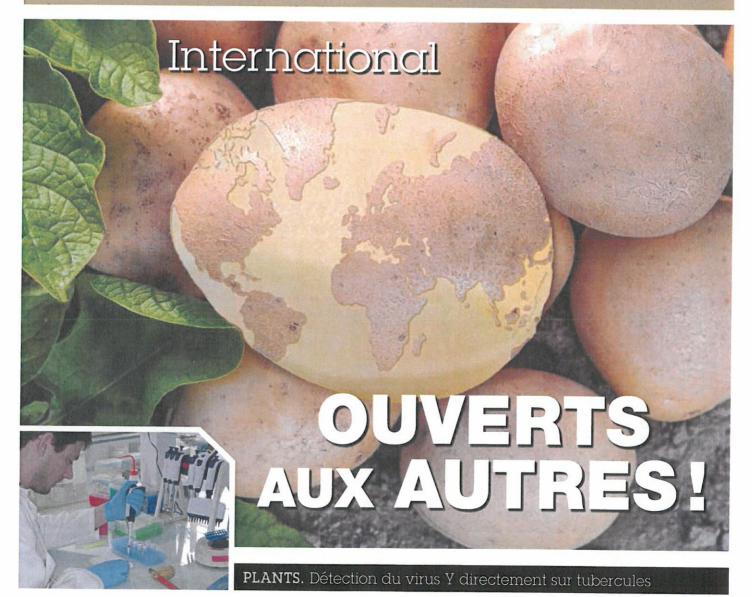
FILIÈRES

Sari Plasmans
SAVOIR SAISIR
LES OPPORTUNITÉS

TECHNIQUE

Tassement profond du sol PÉNALISANT POUR L'ENRACINEMENT ET LA PRODUCTIVITÉ

NOVEMBRE-DÉCEMBRE 2015 | Nº 602



DÉTECTION DU VIRUS Y (PVY)

DIRECTEMENT SUR TUBERCULES

Pour renforcer sa position à l'export, la filière plant se dote d'un outil performant de détection du virus Y : la PCR temps réel (qPCR). Afin d'obtenir un compromis coût-fiabilité acceptable, la filière préconise un groupage par dix tubercules, car cette technique, bien que mille fois plus sensible que le test Elisa, reste cependant six fois plus chère.



La rapidité d'obtention des résultats d'analyse de virus constitue un atout pour l'export.

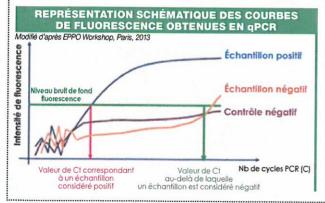
avancée des technologies et des connaissances sur le virus Y (PVY) font que les outils de détection appliqués par les laboratoires de certification des semences sont en constante évolution et permettent de s'adapter aux nouvelles demandes du marché. En effet, si la qualité sanitaire du plant reste un critère prioritaire pour la commercialisation, la rapidité d'obtention des résultats d'analyse constitue un atout face à la concurrence afin de mettre le plant sur le marché le plus rapidement possible. Depuis trois ans. dans le cadre de l'UMT InnoPlant, la FN3PT en collaboration avec l'Inra du Rheu, s'est lancée dans cette évolution technologique afin que la filière française de plant puisse renforcer

notamment sa position à l'export. Depuis le début des années 80, l'Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) associée à la procédure de préculture, est la technique de diagnostic la plus répandue dans les laboratoires de certification en raison de sa sensibilité, sa spécificité, sa praticité, et sa capacité à traiter un grand nombre d'échantillons. Cependant aujourd'hui, on observe en Europe, dans les pays producteurs de plants, un changement de cap, plus ou moins radical, concernant les outils utilisés pour le contrôle (voir encadré page suivante). Malgré ses atouts indéniables, la procédure préculture/Elisa présente cependant quelques points limitants. Sa réalisation est fortement consommatrice en temps puisque six

semaines minimum sont nécessaires pour évaluer l'état sanitaire d'un lot (Figure 1). De plus, certaines variétés présentent des difficultés de levée de dormance. Enfin, son coût financier et humain s'avère important puisque cela nécessite des surfaces de serre conséquentes et de la manutention. Par conséquent, de nombreux laboratoires se sont engagés dans une recherche de nouvelles méthodes de diagnostic applicables directement sur tubercule après la récolte afin de s'affranchir de l'étape de préculture.

LA PCR TEMPS RÉEL (qPCR) : UN NOUVEL OUTIL DE DÉTECTION PERFORMANT

Ainsi depuis quelques années, les outils moléculaires, telle que la PCR



TECHNIQUE / Principe de la qPCR

La PCR temps réel (qPCR), au même titre que la PCR classique (Polymerase Chain Reaction – réaction de polymérisation en chaîne) permet d'avoir accès à l'information génétique des microorganismes par amplification rapide et spécifique d'une région ciblée du génome du pathogène. Mais elle s'en différencie du fait que l'amplification de cette région cible est mesurée non pas à la fin de la réaction mais tout au long de celle-ci, donc en temps réel. À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN amplifié est mesurée grâce à un marqueur fluorescent spécifique du pathogène recherché dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité du fragment d'ADN amplifié produit. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN. Ces courbes de cinétiques sont visibles sur ordinateur grâce à un logiciel permettant de différencier un échantillon positif d'un échantillon sain.

COMPARAISON DE LA MÉTHODOLOGIE ET DE LA DURÉE DE CHACUNE DES ÉTAPES APPLIQUÉES EN PRÉCULTURE-ELISA ET EN QPCR Préculture / Elisa Librarillionnage (groupage par (groupage par plantes) Préculture Estraction automatisée lacide nutricique) ELISA (groupage par s plantes)

Sensibilité Spécificité

> tiplexage Coût

temps réel (qPCR), ont suppléé ou complémenté l'Elisa dans des laboratoires de contrôle comme outil de détection d'agents pathogènes. Depuis 2012, la FN3PT/RD3PT s'est engagée dans l'évaluation de cette méthode. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'identifier l'outil le mieux adapté, en termes de sensibilité, pour détecter le PVY dans un extrait tuberculaire. En conditions

contrôlées, la technique qPCR (voir encadré) s'est avérée être cent fois plus sensible que la PCR classique et mille fois plus que l'Elisa, et ceci quel que soit l'âge physiologique du tubercule (défanage, récolte, un et trois mois de stockage à 4°C). Dans un second temps, chaque étape de la procédure (échantillonnage, broyage du matériel biologique, extraction de l'acide nucléique viral)

→ ZOOM

DANS LES AUTRES PAYS

· Aux Pays-Bas (40000 ha de plants).

Le Nak (Service général de contrôle des semences agricoles et des plants de pomme de terre) applique à grande échelle en certification le diagnostic moléculaire pour les analyses sur les virus de la pomme de terre. Depuis 2014, 100 % de leurs analyses sont réalisées par PCR temps réel et non plus en associant préculture/Elisa. Afin de limiter le coût, ils ont développé des outils permettant la détection simultanée de plusieurs agents viraux (PVY, PVA, PVX), et ont préconisé un regroupement de cinquante tubercules par analyse. Ainsi un lot de deux cents tubercules est traité en quatre analyses, ce qui peut s'avérer insuffisant dans le cas de tubercules faiblement infectés et donner une estimation peu précise du taux d'infection. À partir de cette année, les analyses pourront également se faire par groupage de vingt ou dix tubercules par réaction selon les demandes.

• En Écosse (14800 ha de plants).

La Sasa (Science and Advice for Scottish Agriculture) qui est l'organisme de certification des semences, préconise d'utiliser l'outil qPCR sur un groupage au maximum de dix tubercules. Cependant pour la certification, les notations visuelles au champ associées à un diagnostic Elisa restent la priorité; la technologie qPCR est utilisée dans le cadre de leurs recherches et/ou pour des tests ciblés.

• En Belgique (2700 ha de plants).

Le Centre wallon de recherche agronomique à Libramont (CRA-W) continue en 2015 d'associer le test Elisa à la préculture pour certifier les lots de semences. Pour toutes les analyses de détection ponctuelles en qPCR, les échantillons sont traités par l'Ilvo (Institut pour la recherche agricole et de la pêche) de Gand.

• En Suisse (1500 ha de plants) et au Luxembourg (450 ha de plants). Agroscope de Changins et l'Asta (Administration des services techniques de l'agriculture) qui ont en charge le contrôle phytosanitaire des semences respectivement de Suisse et du Luxembourg sont en cours de remplacement de l'analyse Elisa sur germe par la PCR temps réel.

RAES construct

construction industrielle

bâtiments de stockage et de conditionnement de pommes de terre / oignons /...

www.raesconstruct.fr | T +33 (0)2 30 88 03 18



a été étudiée et optimisée de manière à définir la méthode la plus adaptée aux conditions de testage en routine, tout en conservant un niveau de détection fiable de l'agent pathogène recherché.

La procédure définie est la suivante. Sur les tubercules réceptionnés au laboratoire juste après la récolte, un disque est prélevé au niveau du talon. Au total, dix disques prélevés sur dix tubercules différents sont regroupés et broyés. Ainsi, pour un échantillon de deux cents tubercules, vingt analyses sont réalisées par lot, soit deux fois moins qu'en Elisa. À partir de ce jus, l'acide nucléique total, provenant du virus et du tubercule, est extrait à l'aide d'un robot utilisant une technologie à base de billes magnétiques ayant la capacité de piéger l'acide nucléique et de le nettoyer de tous les organites cellulaires de la plante. Cette technique s'est avérée très performante dans l'extraction d'acides nucléiques à partir de matrices complexes (sols, tubercules...) et est déjà utilisée pour la recherche de nématodes à galle du genre Meloidogyne dans les sols (méthode officielle française). À l'issue de cette étape, l'acide nucléique purifié peut être analysé en aPCR.

UNE PERFORMANCE COÛTEUSE ET DES PRÉCAUTIONS À PRENDRE

De l'extraction de l'acide nucléique à la détection du PVY par la technologie aPCR, un investissement important en équipement (robot d'extraction, appareil aPCR) mais aussi en kits commerciaux est indispensable. ce qui en fait une technologie relativement onéreuse. Par comparaison à l'Elisa, le coût de la aPCR. calculé exclusivement sur la base des consommables, est de l'ordre de six fois plus élevé. Afin de réduire ce coût, la définition d'un niveau de groupage de tubercules est indispensable. Comme toute technique de diagnostic, la technologie aPCR possède un seuil de positivité. Lors de nos travaux, il s'est avéré que le groupage d'un tubercule fortement infecté (contamination de l'année précédente, infection précoce) parmi deux cents tubercules sains donne encore un signal positif en aPCR. En revanche, dès lors qu'un tubercule faiblement infecté (infection tardive)

est regroupé avec plus de dix tubercules sains, celui-là risque de ne plus être détecté du fait que le signal de fluorescence se trouve en dessous du seuil de positivité (Figure 2). Pour avoir un compromis satisfaisant entre coût et fiabilité du test, nous préconisons un groupage par dix tubercules maximum. Dans cette condition, sur quatorze lots commerciaux de deux cents tubercules, soit 280 sous-lots analysés (14 x 20 sous-lots de 10 tubercules) seul un sous-lot a été détecté comme négatif en aPCR alors qu'il a été trouvé positif en préculture/Elisa; soit 99 % de corrélation.

Les travaux de recherche menés au cours de ce projet ont permis de définir une nouvelle méthodologie. Elle concilie fiabilité de détection du PVY et rapidité d'obtention des résultats de qualité sanitaire des semences. En effet, la technique PCR temps réel peut être appliquée directement sur tubercule après la récolte. Cet été, les personnes en charge des analyses de contrôle dans les trois OP de la FN3PT ont été formées et pourront appliquer cette nouvelle méthodologie à partir de cet automne sur des lots de semences ciblés. En effet, le souhait des producteurs n'est en aucun cas de s'affranchir de la préculture/Elisa car, quoique longue et lourde à mettre en œuvre, celle-ci est le reflet de la culture à venir et peut mettre en évidence d'autres désordres rédhibitoires (dérives d'herbicides, étrangers...). De plus, elle reste encore aujourd'hui la méthode la moins chère. La qPCR est à envisager comme une méthode complémentaire et rapide, utilisable notamment pour des exports précoces. Par ailleurs une suite à ces travaux va être de décliner cette méthode en un outil multiplexant plusieurs sondes permettant la détection simultanée du PVY et du PLRV. /

FRÉDÉRIC BOULARD ET LAURENT GLAIS, FN3PT/RD3PT

Les travaux menés ont permis de définir une nouvelle méthodologie. Elle concilie fiabilité de détection du PVY et rapidité d'obtention des résultats de qualité sanitaire des

semences.

