



Détection directe de virus dans les tubercules par PCR temps réel (qPCR)

Laurent GLAIS, Frédéric BOULARD





Transformation



Frais



PLANT



Fécule

➔ **Plant certifié** = gage d'une production de qualité avec un haut niveau de rendement

La certification au niveau des virus



Préculture



ELISA

Procédure de contrôle
actuellement appliquée

2 mois



Récolte



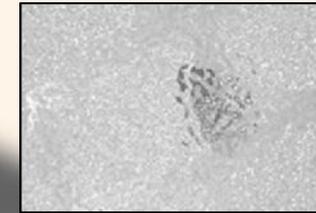
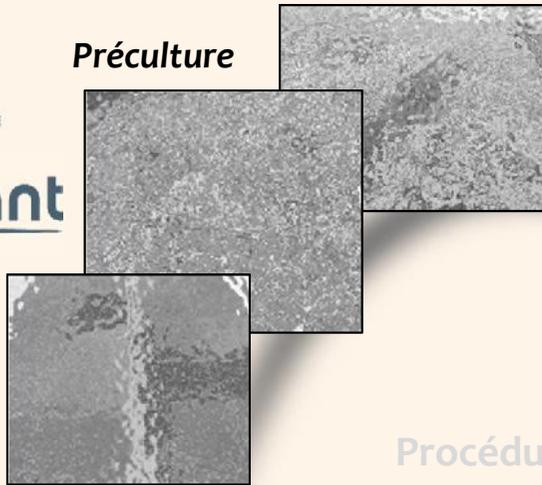
Semence certifiée

- ➔ Plus de **1,2 millions de tests ELISA** sont réalisés chaque année par les quatre laboratoires plant agréés par le SOC (Achicourt, Bretteville, Hanvec, Lavergne)
- ➔ Soit **6 millions de tubercules** analysés

La certification au niveau des virus



Préculture



ELISA

Procédure de contrôle
actuellement appliquée

2 mois



Récolte

Définir une nouvelle
procédure applicable
directement sur
tubercule



Semence certifiée

- ➔ Plus rapide
- ➔ Fiabilité équivalente

... Et demain ?



Problématique

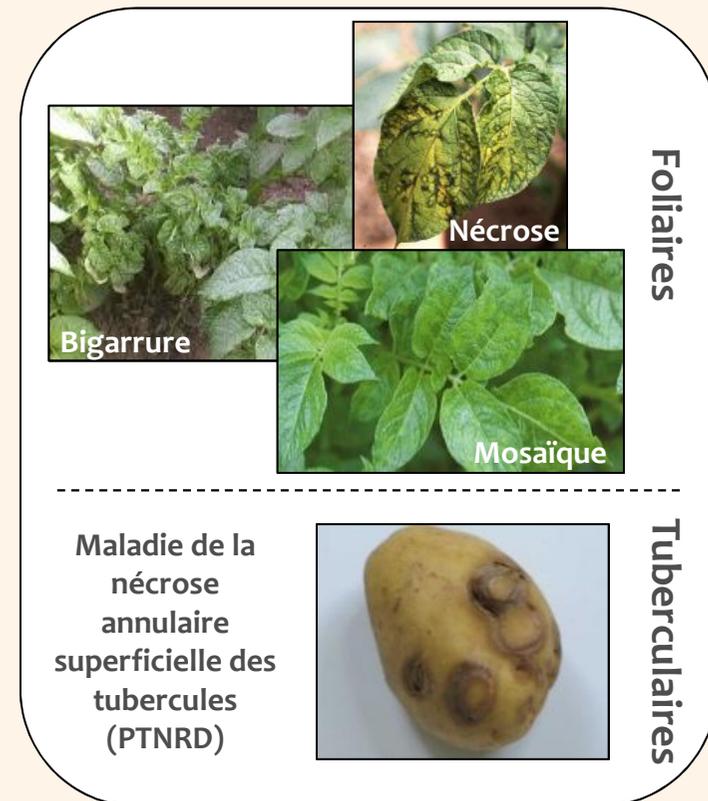
➔ Quelques questions :

- ★ Sur quel(s) virus faut-il se focaliser ?
- ★ Quelle est la technique de diagnostic la plus sensible à partir de tubercules ?
- ★ Quel est l'impact du stade physiologique du tubercule sur l'efficacité de détection du virus ?
- ★ Quelle procédure mettre en oeuvre pour une application en "routine" ?

Pourquoi le virus Y de la pomme de terre (PVY) ?

- ➔ 85% des infections sur pomme de terre sont dues au PVY
- ➔ Incidences économiques fortes
 - ★ Pertes directes (baisse de rendement, de la qualité du produit)
 - ★ Pertes indirectes (production plants sains, contrôle sanitaire)
- ➔ Pas de moyens de lutte direct (prophylaxie, lutte génétique)

Symptômes liés au PVY



Quelle méthode appliquer ?

→ Quatre étapes du processus ont été étudiées

Echantillonnage

- ★ Zone de prélèvement
 - Pelure large
 - Talon
- ★ Impact de l'âge physiologique du tubercule

Broyage

- ★ Lyophilisation
(échantillon = poudre)
- ★ Presse Polhane
(échantillon = liquide)

Extraction

- ★ Kit commercial
(Qiagen)
- ★ Robot (KingFisher)
(InviMagVirus RNA Kit,
Orgentec)

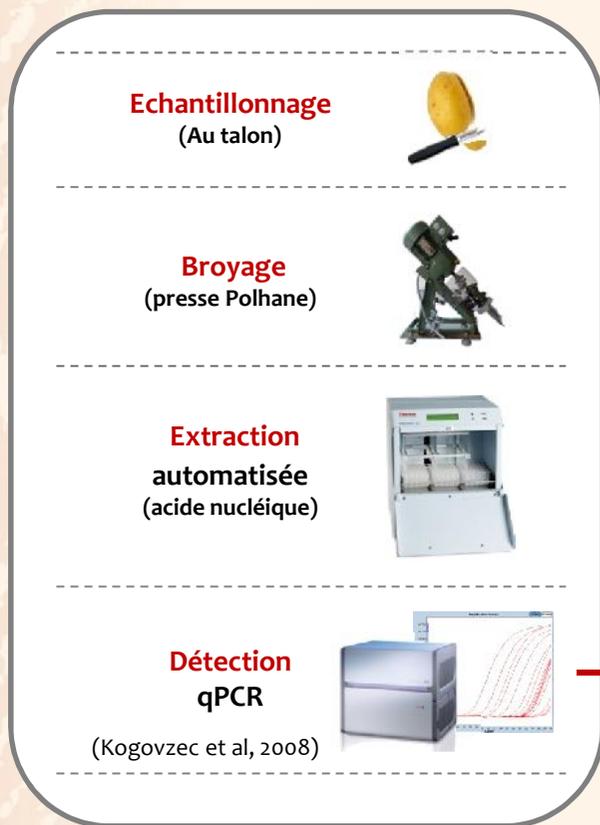
Détection

- ★ ELISA
- ★ PCR
- ★ qPCR
- ★ SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

→ Sélection de la méthodologie la plus adéquate selon différents critères

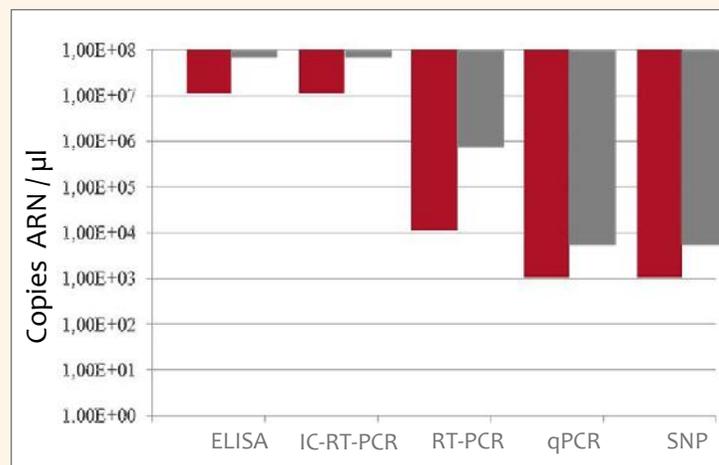
- Sensibilité
- Fiabilité
- Praticité
- Adéquation vis-à-vis du traitement d'un nombre important d'échantillons
- Coût

Quelle méthode appliquer ?

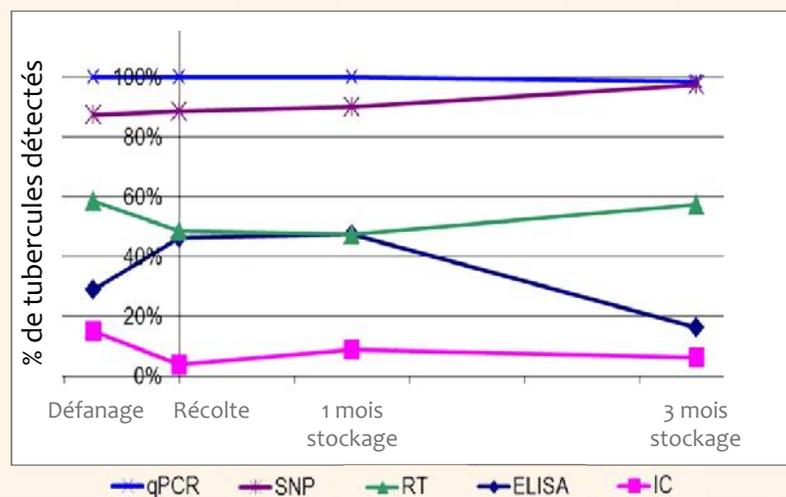


Sensibilité

Fiabilité



■ : Virus purifié seul
■ : Virus purifié + extrait tuberculaire

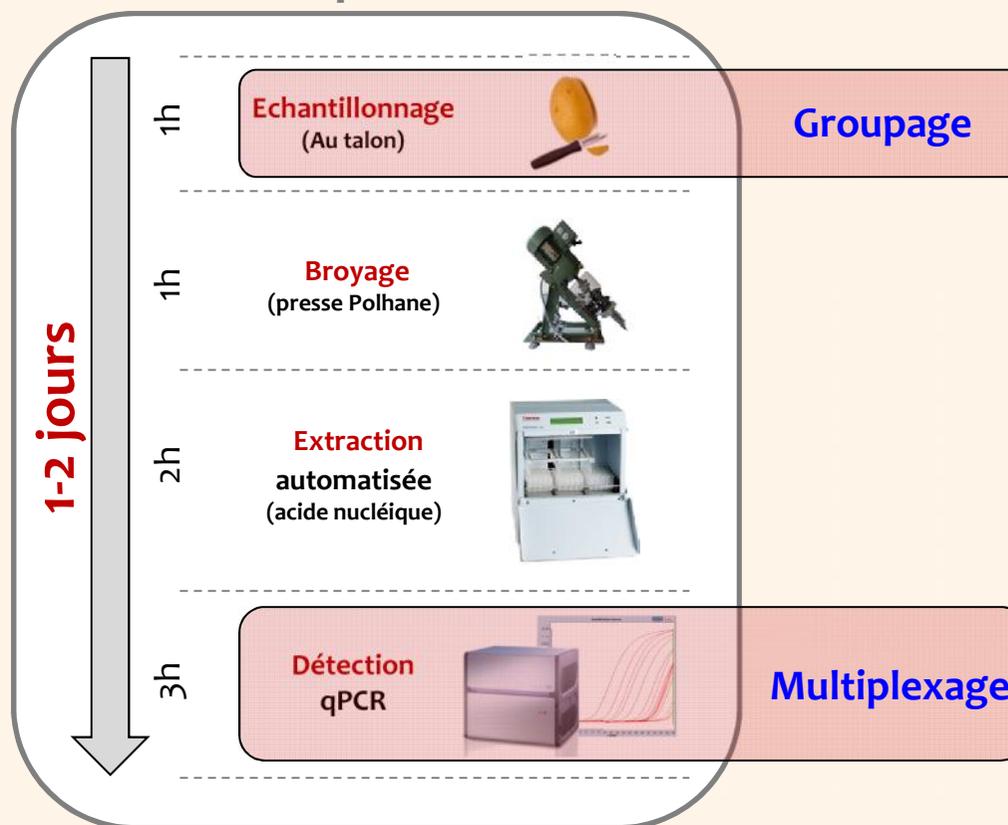


Nouvelle procédure à mettre en œuvre

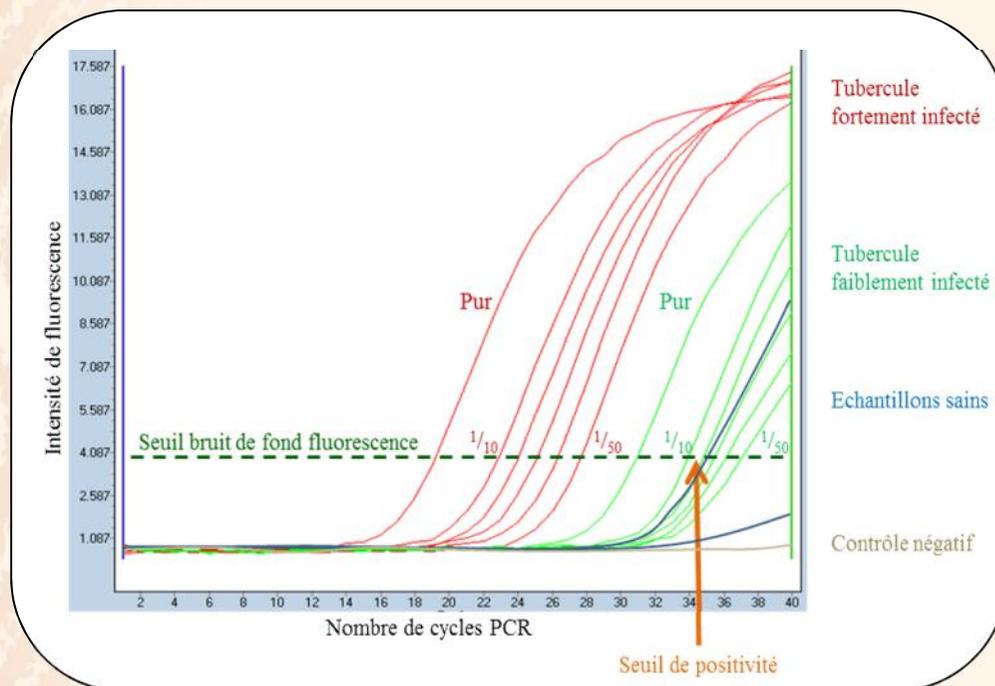


1 lot = 200 tubercules

qPCR



Définir un groupage optimal

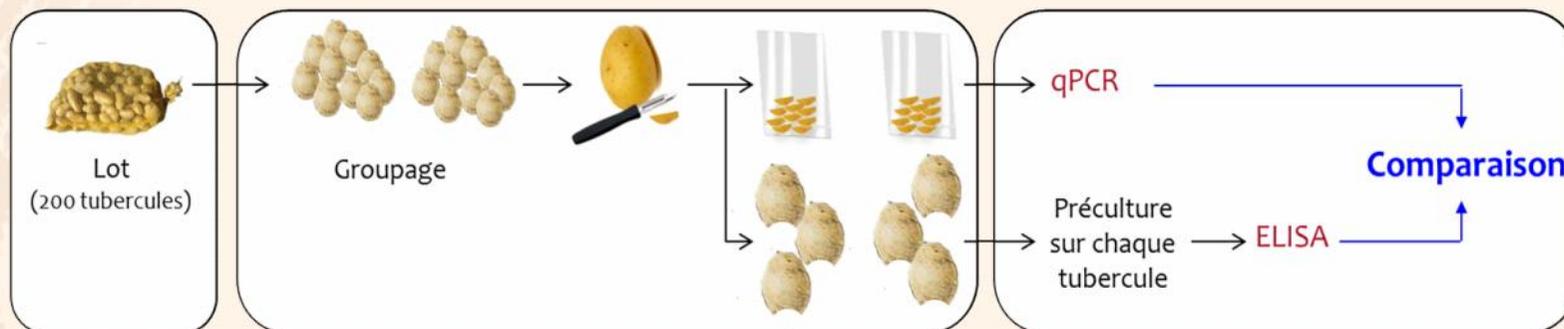


- ★ Un tubercule fortement infecté peut être détecté avec un niveau de dilution = $1/50$ voir plus (200)
- ★ Un tubercule faiblement infecté risque d'être en dessous du seuil de positivité (faux négatifs) si une trop grande dilution est appliquée



Groupage par 10 tubercules = compromis entre coût et fiabilité du test

Validation de la méthode



➔ FN3PT (2014)

★ 14 lots (200 tubercules)

Soit, 14 lots x 20 sous-lots de 10 tub = **280 analyses**

➔ OP Bretagne-Plants (2015-16)

★ 45 lots (~ 200 tubercules)

Soit, 45 lots x 20 sous-lots de 10 tub = **900 analyses**

➔ OP Comité Nord (2016)

★ 23 lots (~ 200 tubercules)

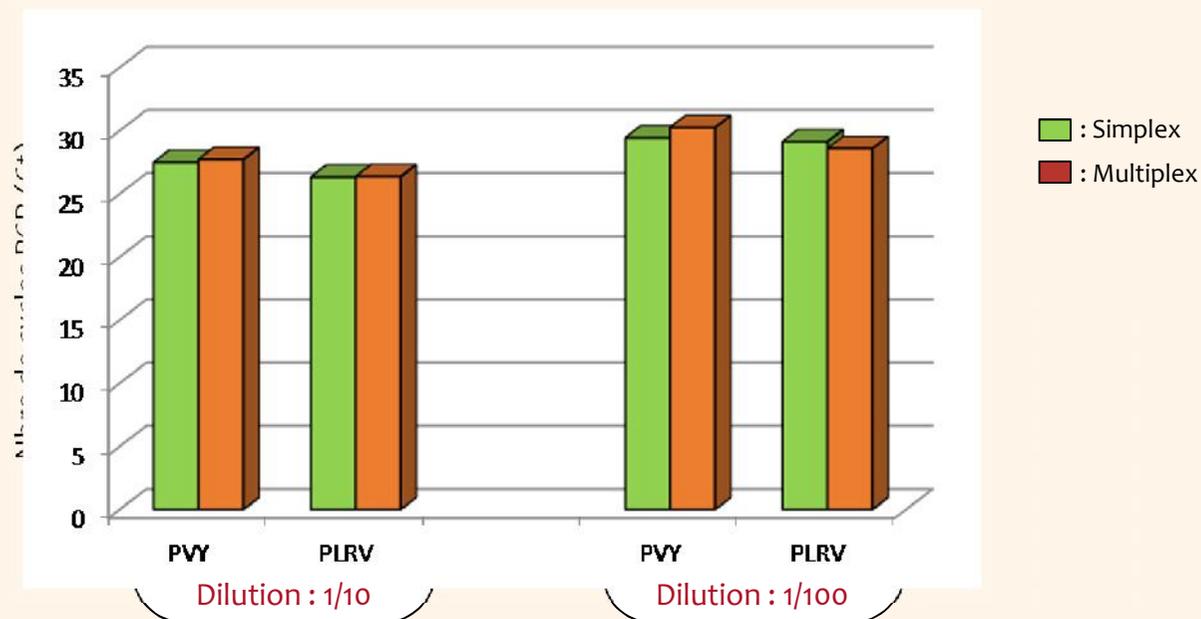
Soit, 23 lots x 20 sous-lots de 10 tub = **460 analyses**



Taux de concordance entre qPCR et préculture-ELISA = 99-100 %

Multiplexage des sondes

➔ **PVY + PLRV** (Agindotan et al., 2007) + **témoin interne**



★ Pas de perte significative de signal lié au passage de simplex à multiplex

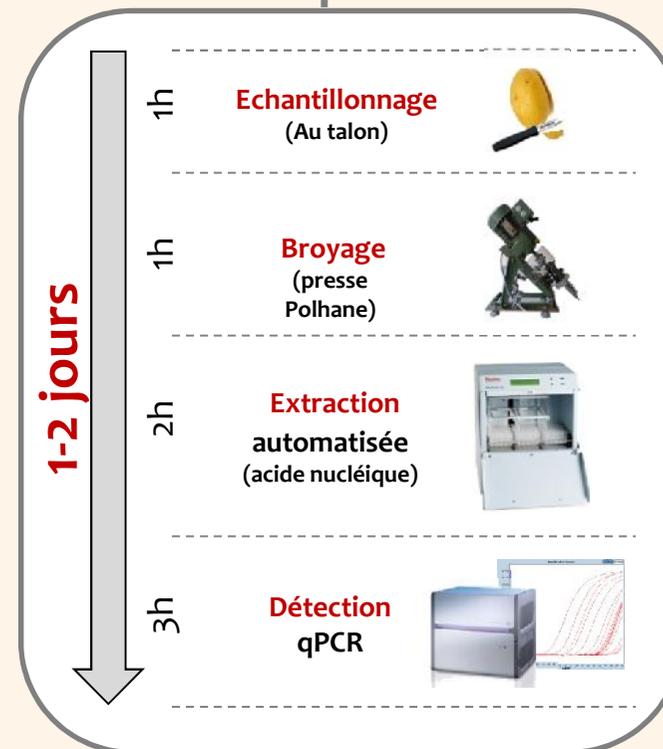
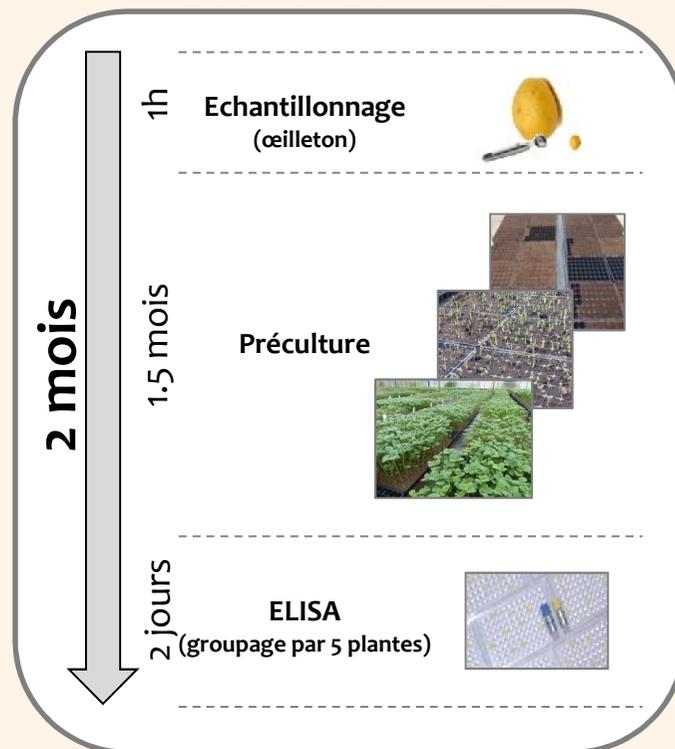
Conclusions

1 lot = 200 tubercules

Préculture / ELISA

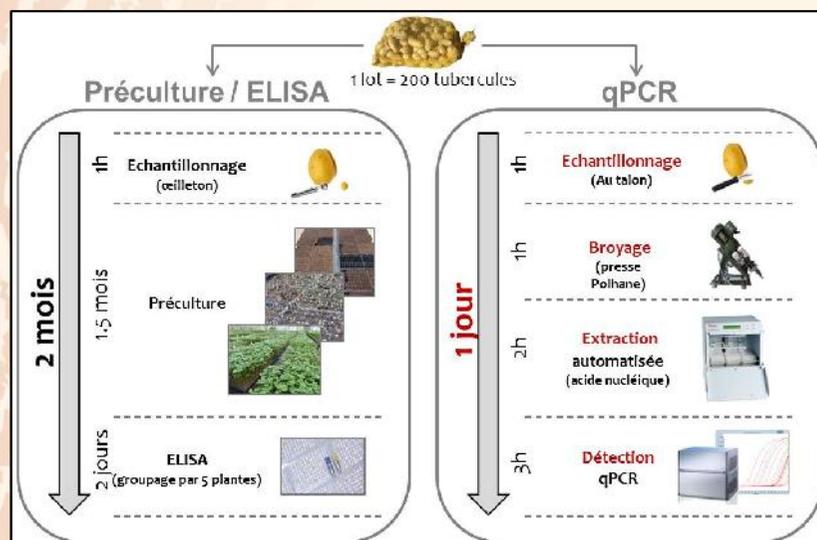
qPCR

- ➔ Groupage par 10 tubercules
- ➔ Multiplexage de 3 sondes qPCR



| | | |
|----|-------------|----|
| ++ | Sensibilité | ++ |
| ++ | Spécificité | ++ |
| - | Rapidité | ++ |
| + | Coût | ++ |

Conclusions



**Juin-Décembre 2015 :
Formations et transfert
vers les OP**



**Application en semi
routine dans les OP
depuis 2016**

➔ Application dans la certification ?

- ★ qPCR envisagée par la filière plant comme **une méthode complémentaire**, utilisable notamment pour des exports précoces.

... Mais la préculture reste toujours importante pour mettre en avant les problèmes de déformation foliaire ou de développement anormal des germes (herbicides, hormones, ...)



- ★ Limiter les coûts liés à l'application de la qPCR (augmentation du groupage)
 - ★ S'assurer de la fiabilité de détection de l'outil lors des infections tardives
- ## ➔ Faire reconnaître par le Service Officiel de Certification (SOC) la méthode qPCR en tant qu'outil de diagnostic



Merci de votre attention !



Laurent GLAIS, Frédéric BOULARD

