

AFPP - SIXIEME CONFERENCE INTERNATIONALE
SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS, FRANCE, 6-7-8 DECEMBRE 2000

LES CONDITIONS DE RENTABILITE DES TROUSSES DE DIAGNOSTIC
MOLECULAIRE DANS LE DOMAINE DE LA CERTIFICATION
PHYTOSANITAIRE

A. CHANDELIER, S. COGNET, J. KUMMMERT et P. LEPOIVRE

Unité de Phytopathologie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques
de Gembloux, 2 Passage des Déportés, B-5030 Gembloux

RESUME :

Les protocoles de certification doivent donner l'assurance que les probabilités d'erreur sont confinées dans des valeurs explicitement définies. Quelle que soit la technique de diagnostic, cette exigence demande d'intégrer les caractéristiques de sensibilité, de spécificité du test et les modalités d'échantillonnage. La convivialité des étapes de l'analyse ainsi que le coût du protocole constituent d'autres éléments d'appréciation. L'application des techniques moléculaires de diagnostic à la pratique agricole dépendra de leur capacité à améliorer la fiabilité de la procédure de certification et de leur adaptation à une utilisation routinière sur un grand nombre d'échantillons. Cette perspective de transposition est discutée au travers des contraintes spécifiques de la certification selon les pathogènes présentés (virus d'arbres fruitiers ou de la pomme de terre, *Ralstonia solanacearum*).

Mots-clés : kit de diagnostic, *Ralstonia solanacearum*, virus, arbre fruitier, pomme de terre

SUMMARY :

CONDITIONS OF PROFITABILITY OF MOLECULAR DIAGNOSTIC KITS IN
THE FIELD OF PHYTOSANITARY CERTIFICATION

Certification procedures must give the guarantee that probabilities of errors are confined in a predescribed range of values. Whatever the technique of diagnostic, these constraints require to integrate the characteristics of sensitivity and specificity of the technique with the sample processing protocol. Robustness and user's friendliness as well as the cost of the protocol are other constraints to be satisfied. The development of the molecular techniques will rest on their capacity to improve the certification procedure and to allow their routine application on large numbers of samples. The perspective of using molecular approach is discussed taking into account specific requirements according to the considered pathogen (fruit tree or potato viruses, *Ralstonia solanacearum*).

Key-words : diagnostic kit, *Ralstonia solanacearum*, virus, fruit tree, potato

INTRODUCTION

L'accroissement considérable du volume des échanges commerciaux intra- et intercontinentaux, ainsi que la mise en place de zones de libre échange économique au sein desquelles les barrières douanières sont progressivement supprimées accroît les risques phytosanitaires et renforcent la nécessité de la délivrance d'un certificat attestant que le matériel a été produit selon des normes phytosanitaires définies (WATERWORTH, 1993).

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis l'émergence de nombreuses techniques de diagnostic reposant sur la détection de séquences d'acides nucléiques. Dans le contexte économique actuel, les innovations touchant les techniques de diagnostic doivent être analysées dans une triple perspective : (i) permettre aux producteurs de plantes et aux services officiels de la protection des végétaux de mieux satisfaire leurs obligations respectives (d'autocontrôle et de surveillance par sondage de la qualité phytosanitaire du matériel végétal produit), (ii) intéresser des sociétés impliquées dans la production de trousse de diagnostic et (iii) rencontrer les contraintes des laboratoires de service qui réalisent les analyses. Il importe dès lors que les différents acteurs économiques impliqués puissent anticiper l'évolution technologique en cours, intégrer ses potentialités et ses limites. Pour ce faire, il est important que les laboratoires de recherche identifient correctement la globalité des contraintes qui permettent l'utilisation des tests moléculaires dans la pratique agricole.

Le présent article est basé sur les principaux résultats obtenus dans le cadre de plusieurs programmes de recherche de l'Unité de Phytopathologie de la Faculté de Gembloux.

LES EXIGENCES AUXQUELLES LES TECHNIQUES DE CERTIFICATION DOIVENT SATISFAIRE

Quelle que soit la technique adoptée, une procédure de certification de la qualité sanitaire du matériel végétal constitue un test classique d'hypothèse. Deux types d'erreurs peuvent se produire à l'issue d'une telle analyse: (i) un résultat faussement positif si la plante saine est déclarée infectée à l'issue de l'analyse et (ii) un résultat faussement négatif si le test conclut à l'absence de l'agent pathogène alors que la plante est contaminée. L'ensemble de la procédure de certification (depuis le protocole d'échantillonnage jusqu'à l'analyse de l'échantillon) doit donner l'assurance que les probabilités de ces deux types d'erreur sont confinées dans une fourchette de valeurs explicitement connues et acceptées par les demandeurs du test (le producteur et l'administration chargée de garantir les bonnes pratiques de la procédure). Une telle démarche d'assurance qualité de la procédure de certification doit prendre en compte à la fois les caractéristiques du test de diagnostic (sensibilité, spécificité, convivialité,...) et les modalités de l'échantillonnage.

Les exigences de sensibilité

La sensibilité est un des principaux atouts des tests moléculaires. En effet, le recours à l'amplification moléculaire, via la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR), permet de multiplier un très grand nombre de fois les séquences cibles de l'agent pathogène reculant les limites de sensibilité des techniques de diagnostic. Il faut cependant garder à l'esprit que la sensibilité et la spécificité d'un test basé sur la PCR dépendent des performances de l'étape d'amplification PCR proprement dite mais également des caractéristiques de la phase de détection des produits amplifiés. D'autre part, la sensibilité d'un test n'est pas un objectif en soi et doit restée appropriée au but poursuivi et à l'échantillonnage pratiqué. Un accroissement de sensibilité n'est intéressant que s'il aboutit à une diminution du risque de faux négatif et à une meilleure fiabilité statistique des conclusions de la certification.

Les exigences de spécificité

La spécificité d'une technique de diagnostic doit être évaluée en fonction de la finalité de sa mise en œuvre. Dans un laboratoire chargé de contrôler le respect des réglementations phytosanitaires de quarantaine ou de certification, la disponibilité de tests de diagnostic peu spécifiques peut contribuer à réduire le nombre d'analyses à réaliser et donc le coût de la procédure. Au contraire, un niveau très élevé de spécificité est requis quand il s'agit de détecter une souche particulière d'un agent pathogène.

Le niveau de spécificité est relativement difficile à contrôler avec les techniques sérologiques car celles-ci ne peuvent cibler que quelques antigènes particuliers exprimés par le génome. Au contraire, s'adressant à l'intégralité du génome du parasite, les techniques d'hybridation moléculaire présentent une plus grande souplesse en permettant de sélectionner plus facilement des motifs moléculaires satisfaisant tantôt des tests polyvalents, tantôt des tests très spécifiques pour pouvoir détecter une souche particulière de l'agent pathogène.

La convivialité des tests

Les contraintes organisationnelles constituent un 3^{ème} critère d'appréciation des méthodes de diagnostic. Cette exigence est particulièrement aigüe si la certification sanitaire conduit à la réalisation d'un grand nombre d'analyses. Bien que la PCR soit largement utilisée dans les laboratoires de recherche, les étapes de pré- et post amplification peuvent représenter des obstacles majeurs à son adoption pour une utilisation routinière. Dans les activités de recherche, l'utilisation de la PCR s'accompagne le plus souvent d'une extraction préalable des acides nucléiques dont la lourdeur exclut des analyses en routine sur un grand nombre d'échantillons. La simplification de la préparation des échantillons constituera un élément essentiel dans la convivialité du test.

A cet égard, les différentes étapes à considérer dans la mise au point du test de détection par PCR sont (i) la préparation des échantillons, (ii) l'optimisation de la réaction PCR ainsi que le choix des amorces et (iii) la détection des produits

d'amplification. Ces 3 étapes de développement doivent cependant être prises en compte globalement. Ainsi une conception correcte des amorces (basée sur de nombreux paramètres comme la séquence, la taille, les températures d'hybridation, l'absence d'auto-appariement,...) permet une amplification efficace autorisant à son tour son application à des extraits moins purifiés. Pour ce qui concerne l'étape de détection des amplicons, l'Unité de Phytopathologie de Gembloux utilise la technique ELOSA (technique d'hybridation des amplicons sur plaque de microtitration suivie d'une révélation enzymatique colorimétrique) qui possède des caractéristiques adéquates de sensibilité et de spécificité. La longueur du produit d'amplification et la présence de séquences spécifiques sont importantes à considérer pour la détection mais dépendent également du choix des amorces.

La validation des procédures d'échantillonnage

La validation des tests sélectionnés en vue de leur utilisation pratique dépend de la mise en place d'une procédure d'échantillonnage (nombre et nature des échantillons, époque de prélèvement,...) qui garantisse la validité des conclusions des tests en relation avec les standards de qualité et qui tienne compte des caractéristiques techniques du kit. L'optimisation de ces procédures d'échantillonnage doit donc tenir compte des caractéristiques de sensibilité et de spécificité de la technique de diagnostic.

ETUDES DE CAS

Les virus d'arbres fruitiers

Chez les ligneux fruitiers, l'indexage biologique demeure à ce jour le protocole le plus largement reconnu pour la mise en évidence des infections virales (NEMETH, 1986). La durée de ces protocoles de détection (parfois plus de 2 ans) et leur coût (incluant l'amortissement des serres ou d'un verger et la main d'œuvre nécessaire à l'entretien des plantes) les rendent mal adaptés aux exigences des transactions commerciales (trop grande lenteur de l'analyse) et au suivi régulier de l'état sanitaire d'un parc à bois (nécessitant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons).

Pour certains virus d'arbres fruitiers, les tests sérologiques sont soit commercialement inexistants (par exemple pour l'« Apple stem pitting » ou ASPV), ou leur utilisation n'est possible que pendant une courte période de croissance de la plante (par exemple pour l'« Apple chlorotic leaf spot » ou ACLSV et l'« Apple stem grooving virus » ou ASGV) étant donné la faible concentration en virus dans les plantes ligneuses. Cette limitation constitue un handicap puisque le contrôle sanitaire du matériel commercialisé devrait être possible toute l'année (surtout sur du matériel ligneux dormant faisant l'objet d'une commercialisation). Enfin, les résultats des tests sérologiques peuvent également être rendus peu fiables par la grande variabilité des souches d'un virus donné (comme c'est le cas pour l'ACLSV) qui augmente les risques de résultats faussement négatifs.

Un choix approprié des amorces accompagné par l'optimisation des paramètres relatifs aux cycles d'amplification PCR nous permet de détecter les 3 virus (ACLSV, ASGV et ASPV) à partir d'extraits bruts de feuille ou d'écorce d'arbres virosés. Les tests RT-PCR ainsi développés qui sont applicables toute l'année (y compris sur bois dormant), allient donc spécificité, sensibilité et simplicité de la préparation des échantillons (KUMMERT *et al.*, 2000).

La confrontation des résultats de la RT-PCR sur échantillons de bois dormant et de l'indexage biologique a été réalisée pour les 3 virus sur une cinquantaine d'échantillons reçus du CTIFL de Lanxade. Pour l'ASGV et l'ASPV (virus répartis uniformément chez le pommier), on note que, respectivement 82% et 87% des échantillons testés présentent des résultats identiques (positifs ou négatifs) avec les 2 techniques. La RT-PCR apparaît généralement plus sensible. Six (pour l'ASGV) et 8 (pour l'ASPV) échantillons (sur les 55 analysés) se sont avérés positifs en RT-PCR alors que l'indexage des arbres originels n'avait pas révélé leur présence. Seuls les échantillons d'un arbre positif pour l'ASPV et 2 arbres positifs pour l'ASGV n'ont pas permis la mise en évidence de ces virus par RT-PCR à partir de l'échantillon reçu. La répartition de l'ACLSV étant plus hétérogène dans la couronne des arbres, la mise au point d'une procédure d'échantillonnage devra d'abord être réalisée avant de comparer ces 2 techniques pour la détection de ce virus.

Enfin, la PCR multiplex (amplification simultanée des 3 virus à partir d'un même extrait brut) renforce la compétitivité des techniques d'amplification de séquences nucléotidiques par rapport à la sérologie qui est moins sensible.

Les virus de la pomme de terre

En Belgique, toute parcelle de multiplication de la pomme de terre est soumise à un contrôle phytosanitaire visant à la classer dans une catégorie de certification en fonction notamment de son niveau d'infection par les virus PVY, PVX, PVS et PLRV. Un minimum de 100 tubercules prélevés au champ juste avant la récolte sont analysés individuellement, après la levée de dormance, par DAS-ELISA.

L'optimisation des amorces et des paramètres du cycle PCR ont conduit au développement d'un protocole permettant la détection du virus Y de la pomme de terre partant d'extraits bruts de feuille ou de tubercules après levée de leur dormance. Lorsque l'analyse est réalisée sur tubercules, ces tests utilisent des extraits bruts préparés, comme pour les tests sérologiques, avec un extracteur de jus (Sapex Bioreba) (CHANDELIER *et al.*, 2000). Une même approche est adoptée pour les autres virus de la pomme de terre (PRLV, PVS, PVX). Dans le contexte de la certification de la pomme de terre, les protocoles d'analyse moléculaire par RT-PCR restent néanmoins trop coûteux par rapport aux tests sérologiques et l'augmentation de sensibilité obtenue (le seuil de détection est 5 pg de PVY par réaction) reste insuffisante pour travailler sur tubercules dormants. Le simple remplacement des analyses sérologiques par les troussees moléculaires, tout autre facteur restant inchangé dans la procédure de certification, n'offre donc guère d'intérêt ni pour le producteur, ni pour le laboratoire d'analyse.

Au contraire, une modification des modalités d'échantillonnage permettrait de tirer parti de cette sensibilité accrue. En utilisant la technique du maximum de vraisemblance (GENG *et al.*, 1983), nous avons établi un abaque permettant d'établir le niveau d'infection (p) d'une parcelle sur base d'un nombre de lots enfermant au moins une feuille ou un tubercule infecté. Cet abaque tient compte du nombre total d'unités (T) (tubercules ou feuilles) qui composent l'échantillon récolté sur une parcelle, du nombre de lots soumis à l'analyse (k) et de la taille des lots (n). En faisant varier ces différents paramètres (T , n , k et p), nous avons évalué le risque β (qui désigne la probabilité de conclure erronément que le pourcentage de tubercules infectés est inférieur à la valeur autorisée pour une classe phytosanitaire donnée) pour une analyse groupée des échantillons ($n > 1$) ou une analyse individuelle ($n = 1$). Cette analyse montre que la valeur du risque β diminue avec l'augmentation de l'effectif total (T). Par contre, la taille des lots (n) a peu d'influence sur la valeur du risque β . L'analyse d'échantillons groupés représente la seule solution pour maintenir ou réduire le coût de l'analyse tout en augmentant le nombre de tubercules (ou feuilles) qui composent l'échantillon. Cette solution suppose que l'on dispose d'une technique de détection suffisamment sensible pour permettre la détection d'une unité infectée (tubercule ou feuille) dans un lot de taille importante ($n = 20$ ou $n = 40$). Des essais réalisés dans notre laboratoire ont montré qu'il était possible de détecter un volume d'extrait de tubercule infecté par du PVY dans au moins 39 volumes d'extrait de tubercule sain en utilisant la RT-PCR-ELOSA. Chez la pomme de terre, la sensibilité de la technique moléculaire pourrait donc améliorer la fiabilité statistique de la procédure de certification sans augmenter le coût d'analyse pour le producteur.

Dans d'autres cas, c'est au contraire la spécificité des tests moléculaires qui s'avère déterminante. Chez la pomme de terre la détection de la souche NTN du virus Y revêt une importance particulière. Cette souche, appartenant au groupe N du PVY, induit des symptômes de nécrose sur les tubercules de variétés sensibles comme Nicola (LE ROMANCER et NEDELLEC, 1997). Comme aucun test sérologique ne permet de détecter spécifiquement cette souche du PVY, il y a un réel besoin d'un test qui permettrait la détection de cette souche. Ce test a été développé et permet l'analyse par RT-PCR-ELOSA à partir d'extraits bruts foliaires ou de tubercules.

Ralstonia solanacearum

Parmi les bactérioses rencontrées chez la pomme de terre, l'agent responsable de la pourriture brune (causée par *Ralstonia solanacearum*) requiert la mise au point de kits de diagnostic. Il s'agit d'un agent de quarantaine dont la présence est formellement prohibée, exigeant donc un test particulièrement sensible. Des tests officiels basés sur l'observation visuelle de symptômes, l'inoculation à des plantes sensibles (l'aubergine) ou d'immunofluorescence sont actuellement en vigueur. Ces tests présentent l'inconvénient d'être particulièrement longs (tests aubergine) ou insuffisamment sensibles (par immunofluorescence).

Nous avons mis au point un test PCR (i) suffisamment sensible pour détecter une infection latente sur tubercules, (ii) capable de distinguer la race 3 de *R. solanacearum* (provoquant des symptômes sur pomme de terre) des autres pathovars et (iii) adapté à une analyse en routine (détection des produits PCR par hybridation sandwich en plaques multipuits).

Le protocole proposé s'appuie sur une bio-PCR qui effectue une double amplification. Dans un premier temps, les faibles populations du pathogène se multiplient dans un milieu de culture (amplification biologique) et un aliquot du milieu de culture semi-sélectif est ensuite soumis à la PCR (amplification enzymatique). Cette double amplification réduit la probabilité de faux positifs qui résulteraient de la présence de bactéries mortes dans le tubercule. L'amplification enzymatique cible une région de l'opéron ribosomique dont le choix s'explique par deux caractéristiques : d'une part sa présence en multiples copies au niveau du chromosome bactérien augmente la sensibilité du test et, d'autre part, l'existence de zones conservées et non conservées permet d'identifier des régions spécifiques de genres, d'espèces voire de pathovars de bactéries (CHANDELIER *et al.*, 1998).

Dans le cas particulier de *R. solanacearum*, l'hybridation sandwich en plaque multipuits n'apporte pas de gain significatif de sensibilité par rapport à la révélation en gel d'agarose. L'hybridation ELOSA est cependant importante puisque cette étape permet d'introduire un deuxième contrôle de la spécificité. Alors que les amorces génèrent une amplification non spécifique avec certaines souches de *R. picketti*, l'hybridation des produits d'amplification restaure une spécificité totale vis-à-vis des espèces bactériennes proches de *R. solanacearum* et vis-à-vis des autres races de cette même espèce. Ce test permet de détecter un tubercule atteint parmi 200 et le seuil de détection est de l'ordre de la dizaine de bactéries dans le jus de tubercule.

CONCLUSION

Si l'utilisation des techniques moléculaires est très répandue dans les laboratoires de recherche, leur utilisation pratique dans les procédures de certification se heurte encore à beaucoup de difficultés objectives ou à des réticences plus subjectives de la part des utilisateurs. Malgré leur performance en termes de sensibilité et spécificité, la sophistication des techniques moléculaires est restée un obstacle majeur. Les progrès réalisés avec les techniques moléculaires basées sur la PCR, tant au niveau de la préparation des échantillons (allant jusqu'à l'utilisation d'extraits bruts), qu'au niveau de la révélation spécifique des produits amplifiés (dans notre cas par une réaction colorimétrique PCR-ELOSA) rendent plausibles les perspectives d'automatisation de ces techniques et leur utilisation en routine pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Par ailleurs, le coût des appareils spécifiquement associés à ces techniques moléculaires (thermocycleur) diminue et la PCR-ELOSA

utilise un équipement (lecteur pour plaques de microtitration) répandu dans les laboratoires d'analyse qui effectuent des tests sérologiques.

Si les progrès réalisés rendent techniquement faisable une utilisation routinière des techniques moléculaires, leur coût constitue encore un obstacle important. Le calcul du rapport coût/bénéfice lié à leur utilisation est donc essentiel.

A cet égard, une approche globale doit être adoptée afin de voir comment les tests moléculaires peuvent modifier les procédures d'échantillonnage afin d'améliorer la fiabilité statistique des conclusions de la certification. Une telle démarche globale de la procédure de certification repose donc à la fois sur les caractéristiques du test de diagnostic (sensibilité, spécificité, robustesse) et sur les modalités de l'échantillonnage. Les exemples qui sont présentés dans cet article montrent comment les tests moléculaires peuvent devenir compétitifs par rapport aux autres tests disponibles. Ce sont tantôt leurs caractéristiques de sensibilité (cas des arbres fruitiers) ou de spécificité (cas de la souche NTN du virus Y de la pomme de terre) qui sont déterminantes, ou encore la fiabilité statistique accrue qu'ils permettent d'obtenir grâce à une réorganisation des protocoles d'échantillonnage (cas des virus de la pomme de terre). Dans tous les cas, une simple transposition de l'approche moléculaire dans les procédures actuelles, tout autre facteur restant identique, paraît illusoire.

BIBLIOGRAPHIE

- CHANDELIER A., COGNET S., MARINHO V.L., KUMMERT J. and LEPOIVRE P., 1998. Development of routine detection tests using PCR for certification. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 63/4b, 1473-1478.
- CHANDELIER A., DUBOIS N., BAELEN F., DE LEENER F., WARNON S., REMACLE J. and LEPOIVRE P., 2000. RT-PCR ELOSA tests for pooled samples for the detection of virus Y in potato tubers. *J. Virological Methods* (sous presse).
- DESIGNES J.C., 1999. Virus diseases of fruit trees. Ctifl (Ed) Paris, 202p.
- GENG S., CAMPBELL R.N., CARTER M. and HILLS F.J., 1983. Quality control programs for seed borne pathogens. *Plant Disease*, 67, 236-241.
- KUMMERT J., VENDRAME M., STEYER S. and LEPOIVRE P., 2000. Development of routine RT-PCR Tests for certification of fruit tree multiplication material. *Bull. OEPP* (sous presse).
- LE ROMANCER M. et NEDELLEC M., 1997. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *Plant Pathol.*, 46, 104-111.
- LEPOIVRE P., KUMMERT J., COLINET D., DUTERME O. et ANCEAU C., 1994. Techniques moléculaires de détection et d'identification des agents pathogènes. *Cahiers Agricultures*, 3, 217-225.
- WATERWORTH H., 1993. Processing foreign plant germplasm at the national plant germplasm quarantine center. *Plant Disease.*, 77, 854-859.