

ARBRES FRUITIERS ET VIRUS : LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

par J. KUMMERT et P. LEPOIVRE

Centre national de Phytovirologie (Section 1)

Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Unité de Phytopathologie

Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture

Direction générale Recherche et Développement — Recherche contractuelle

(Extrait d'AGRICONTACT, n° 302 / 1998)

INTRODUCTION

Des directives européennes (directives 91/682/CEE, 92/33/CEE et 92/34/CEE) et les règlements nationaux [Arrêté Royal du 15/05/1995 et Règlement "fruits 07/97" de la Direction générale de la Qualité des matières premières — Service Matériel de Reproduction (Ministère fédéral des Classes moyennes et de l'Agriculture)] régissent le contrôle de la qualité phytosanitaire du matériel de multiplication des plants fruitiers et ornementaux commercialisés (matériel de prébase, de base et certifié).

Cette réglementation exige l'inscription de tout fournisseur de plants auprès du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture et le respect des prescriptions de l'AR précité. Dans ce cadre, le matériel végétal doit subir une procédure de contrôle de qualité permettant au producteur de certifier qu'il est conforme aux normes définies pour les marchés communautaires. Par ailleurs, chaque organisation professionnelle demeure libre d'imposer, pour les filières de production dont elle est responsable, des seuils plus sévères que les normes légales afin de valoriser un label de qualité via les lois du marché.

Quelle que soit la culture concernée, la mise en place de filières de multiplication de plantes certifiées exige :

- la disponibilité d'un matériel végétal de prébase assaini (matériel micropropagé, pieds-mères issus de culture *in vitro* et/ou de thérapie);
- une conduite des parcs à bois et des pépinières permettant de satisfaire aux normes phytosanitaires;
- l'existence de techniques de diagnostic sensibles, rapides, faciles à mettre en œuvre et dont le coût est économiquement justifié par la

valeur du produit.

Dans ce contexte, les progrès de la biologie moléculaire ont permis l'émergence de nombreuses techniques qui pourraient connaître très prochainement des développements conduisant à une commercialisation de tests de diagnostic des agents pathogènes des plantes. Il importe dès lors que les utilisateurs de ces différentes techniques (pathologistes, producteurs de plants, services officiels, laboratoires agréés, ...) soient correctement informés des avancées technologiques qui s'y rapportent, de leurs potentialités et de leurs limites.

Le présent article analyse les potentialités de ces techniques moléculaires de détection et d'identification des virus d'arbres fruitiers en vue de leur utilisation dans la pratique horticole. Il est basé sur les résultats obtenus dans le cadre d'un programme de recherche subsidié par le Ministère fédéral des Classes moyennes et de l'Agriculture (DG 6) qui concernait la mise au point d'un test de diagnostic moléculaire des virus des taches chlorotiques du pommier (ACLSV), de la cannelure des tiges du pommier (ASGV) et du bois strié du pommier (ASPV).

LES EXIGENCES AUXQUELLES DOIVENT SATISFAIRE LES TESTS DE DIAGNOSTIC

D'une manière générale, le diagnostic de l'infection virale peut reposer sur (i) la détection d'entités infectieuses de l'agent pathogène par inoculation de plantes indicatrices (= tests d'indexage biologique), (ii) la mise en évidence de molécule(s) synthétisée(s) par l'agent pathogène grâce aux tests sérologiques ou (iii) la révélation de séquences d'acides nucléiques spécifiques au génome de cet agent pathogène (= tests moléculaires) (Lepoivre et al., 1994).

Quelle que soit la technique adoptée, la validation d'un test de diagnostic pour le contrôle de la qualité sanitaire du matériel de plantation doit se prémunir des deux types d'erreurs qui 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. Tout protocole d'analyse réalisé par un laboratoire agréé devrait donner l'assurance que les probabilités de ces deux types d'erreurs sont confinées dans une fourchette de valeurs explicitement connues et acceptées par le demandeur du test (le producteur) et l'administration chargée de garantir les bonnes pratiques de la procédure. Une telle démarche d'"assurance qualité" de l'analyse repose sur un choix approprié des techniques de diagnostic et des modalités de l'échantillonnage.

La détection d'un agent pathogène exige que la sensibilité de la technique adoptée permette la mise en évidence des infections latentes chez les plantes ne présentant pas de symptômes. Outre ces exigences de sensibilité (qui réduisent à un niveau acceptable les risques d'un résultat faussement négatif) et de spécificité (qui réduisent la probabilité d'un résultat faussement positif), les tests de diagnostic devront également être faciles à manipuler afin de les appliquer en routine sur un nombre important d'échantillons. Enfin, la durée du protocole d'analyse doit être compatible avec les exigences de la commercialisation (idéalement les tests devraient être réalisables sur bois dormant ou matériel en végétation et donner des résultats avant la saison suivante de greffage, le tout à un coût supportable par les utilisateurs).

LES LIMITES DES TESTS BIOLOGIQUES ET SEROLOGIQUES

Chez les ligneux fruitiers et ornementaux, l'indexage biologique par greffe sur plantes ligneuses demeure, à ce jour, le système de référence utilisé pour la mise en évidence d'un grand nombre d'infections virales (Nemeth, 1986). La durée de ces protocoles de détection (parfois plus de 2 ans), leur coût (incluant l'amortissement des serres ou d'un verger et la main-d'œuvre nécessaire à l'entretien des plantes pendant une telle période), ainsi que la variabilité des résultats qu'ils peuvent donner selon les

conditions de réalisation du test, 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). Par ailleurs, le nombre réduit d'espèces indicatrices le plus souvent utilisées par les laboratoires pratiquant ces analyses et la non spécificité des symptômes induits sur certaines de ces plantes tests, rendent l'identification des virus imprécise.

Les tests sérologiques reposent sur la réaction entre un antigène (par exemple une protéine virale) et les anticorps produits par un animal à sang chaud immunisé par injection de ces mêmes molécules. La spécificité des réactions anticorps - antigène et le marquage enzymatique des anticorps en vue de révéler la formation du complexe anticorps-antigène, a conduit à la commercialisation d'un ensemble de tests immuno-enzymatiques (principalement les tests ELISA sur plaque de microtitration) par plusieurs sociétés privées. Dans le cas particulier des virus d'arbres fruitiers travaillés par le programme, ces sérums sont soit commercialement inexistantes (en ce qui concerne l'ASPV) ou leur utilisation n'est possible que pendant une courte période de croissance active de la plante (en ce qui concerne l'ACLSV et l'ASGV) en raison de la faible concentration en virus des tissus ligneux alors que le contrôle sanitaire du matériel devrait être possible toute l'année (y compris sur du matériel ligneux dormant faisant l'objet d'une commercialisation). Les tests sérologiques peuvent également être rendus peu fiables par la grande variabilité des souches virales (comme c'est le cas pour l'ACLSV) qui augmente les risques de résultats faussement négatifs.

LES TECHNIQUES MOLECULAIRES : LEURS POTENTIALITES ET LEURS LIMITES

Le principe de l'hybridation moléculaire repose sur la capacité que possèdent deux chaînes d'acides nucléiques complémentaires, placées dans des conditions adéquates de salinité et de pH, de se dissocier lorsqu'elles sont portées à une température élevée (proche de 100°C), et de se réassocier lorsqu'elles sont soumises à un refroidissement lent.

De la même manière, des séquences marquées d'ADN ou d'ARN spécifiques du génome de

MATERIEL VEGETAL DE PLANTATION

Tableau 1 — Analyse comparative des performances des différents tests de diagnostic de l'infection virale applicables aux arbres fruitiers et ornementaux

Caractéristiques du test	Indexage biologique	Test sérologique		Tests moléculaires RT-PCR ELISA
		ELISA	Dot blot	
Sensibilité	+	±	-	+
Spécificité	+(?)	+	+	+
Rapidité de la réponse	-	+	+	+
Coût	±	-	±	+

l'agent pathogène (= séquences sondes) sont capables, sous certaines conditions, de s'hybrider spécifiquement aux séquences complémentaires (= séquences cibles) qui sont présentes dans l'extrait d'une plante infectée, en formant des molécules bicaténares stables marquées, permettant, de la sorte, de conclure à la présence de l'agent pathogène.

LES TESTS D'HYBRIDATION MOLECULAIRE PAR "DOT BLOT"

La technique d'hybridation moléculaire réalisée sur membranes de nitrocellulose ou de nylon, sur lesquelles a été préalablement déposé et fixé l'échantillon à tester (technique du "dot blot"), constitue une technique de diagnostic facile et rapide pour la détection de différents types d'agents pathogènes. Des sondes dites "froides" (car ne comportant pas d'éléments radioactifs pour leur marquage) ont été développées depuis une dizaine d'années (Kummert et al., 1995b). Bien que leur utilisation entraîne une moindre sensibilité des tests d'hybridation moléculaire, l'intérêt de telles sondes réside dans le fait que leur synthèse et leur utilisation ne nécessitent pas d'infrastructures spécialement équipées et agréées pour la manipulation et le stockage des produits radioactifs. La détection de ces chambres froides fait appel à des systèmes enzymatiques simples (peroxydase ou phosphatase alcaline), qui transforment un substrat incolore et soluble en un précipité coloré ou luminescent, permettant ainsi sa visualisation rapide. Quand la concentration en virus de l'échantillon à analyser est élevée, l'hybridation par "dot blot" présente l'avantage de pouvoir être réalisée à partir d'extraits peu purifiés de plante et de permettre l'analyse d'échantillons multiples sur un même support. Dans les cas des virus d'arbres fruitiers étudiés, de

telles réactions d'hybridation par "dot blot" permettent d'identifier aisément les agents viraux étudiés (ASGV, ASPV et ACLSV) dans des préparations virales purifiées ou dans des extraits préparés à partir de plantes tests (plantes herbacées cultivées en terre et multipliant abondamment les virus étudiés). Par contre, cette même technique apparaît insuffisamment sensible pour détecter ces virus dans les extraits d'acides nucléiques totaux des plantes ligneuses dont les concentrations virales sont faibles. L'utilisation des tests d'hybridation par "dot blot" pour la certification des plants fruitiers se trouve donc limitée par le nombre de molécules cibles présentes dans l'échantillon à caractériser.

LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (PCR™)

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 ainsi les limites de sensibilité des techniques de diagnostic basées sur l'hybridation moléculaire. Au niveau de la recherche, la PCR a également grandement facilité les opérations d'obtention et de clonage des sondes (utilisables pour les analyses par dot blot), lorsque les séquences nucléotidiques de l'agent pathogène en cause sont connues mais que l'obtention de préparations purifiées de cet agent pose problème (virus instable tel que l'ASPV).

Dans les conditions d'un laboratoire de recherche, l'extrait végétal utilisé pour réaliser les réactions de RT-PCR consiste en des préparations purifiées d'ARNs totaux. Leur obtention requiert des protocoles d'extraction relativement complexes faisant appel à des produits toxiques (phénol, chloroforme, ...). Cette préparation, trop

lourde dans la perspective d'un test routinier, est pourtant habituellement requise pour les virus à génome d'ARN, pour lesquels la réaction PCR ne peut être réalisée qu'après une rétro-transcription sous forme d'ADNc des ARN viraux (d'où l'appellation RT-PCR). Ces deux étapes du test RT-PCR peuvent être inhibées par la présence de contaminants en concentration trop élevée dans des préparations insuffisamment purifiées.

D'autre part, la sensibilité et la spécificité du test dépendent des performances de l'ensemble des étapes d'amplification PCR et de détection des produits amplifiés par PCR. La révélation classique des produits d'amplification PCR par leur fluorescence sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium est une technique relativement peu sensible (générant des risques significatifs de faux négatifs pour les virus des arbres fruitiers dont la concentration est faible en dehors des périodes de croissance active des arbres).

De plus, une caractérisation de ces produits d'amplification basée sur leur seule taille n'exclut pas les risques de faux positifs si des amplifications non spécifiques ou des contaminations accidentelles ont généré des produits d'amplification de taille identique à celle qui est attendue. La détection des produits d'amplification par Southern blot après électrophorèse (détection des produits d'amplification par hybridation à une sonde après leur transfert sur membrane) rencontre ces exigences de sensibilité et de spécificité mais s'avère inapte au traitement d'un grand nombre d'échantillons.

Avec les techniques optimales d'extraction des ARN totaux, la RT-PCR suivie d'une révélation des produits d'amplification par le bromure d'éthidium permet néanmoins de détecter les trois virus concernés toute l'année à partir de tissus ligneux (Kummert et al., 1998).

Dans une perspective d'utilisation routinière de la PCR, des problèmes subsistent cependant étant donné (i) la lourdeur des protocoles de préparation des échantillons, (ii) les risques de contaminations accidentelles des échantillons et (iii) la sensibilité et la spécificité insuffisantes de l'étape de détection des produits d'amplification.

La simplification des protocoles de RT-PCR et l'augmentation de leur sensibilité permet d'envisager une utilisation routinière des tests de détection moléculaire.

La réduction des risques de contamination liés aux manipulations

Des kits récents nous ont permis de réaliser les deux réactions de la RT-PCR (transcription de l'ARN et amplification de séquences d'ADN) de manière séquentielle dans un même tube, réduisant de ce fait les manipulations et les risques de contamination des échantillons (Mallet et al., 1995).

La simplification des protocoles de préparation des échantillons

La littérature commence à proposer des alternatives à l'extraction classique des acides nucléiques totaux en vue de l'amplification de séquences virales par PCR.

Une approche très prometteuse en termes de simplification de la préparation des échantillons à analyser repose sur la capture des particules virales sur plaque de microtitration par des anticorps appropriés (immunocapture), suivie de PCR (Wetzel et al., 1992). Cette technique d'immunocapture-PCR (IC-PCR) a été utilisée avec succès pour l'ACLSV (Kummert et al., 1995a). Lorsque l'absence de sérum commercialement disponible ne permet pas d'envisager le recours à l'IC-PCR, un protocole de préparation des acides nucléiques par adsorption/désorption sur silice a été utilisé avec succès avec l'ASVP et s'avère adapté à l'automatisation.

Enfin les caractéristiques des amorces PCR qui ont été conçues pour l'ASGV permettent la réalisation des différentes étapes du processus dans un seul et même tube à partir d'extraits bruts de tissus ligneux.

Ce système s'est montré fonctionnel pour la détection de ce virus tout au long de l'année dans des tissus (feuilles et tiges) de pommiers infectés.

La plus grande spécificité et sensibilité de l'étape de détection des produits d'amplification

Différents protocoles ont été récemment proposés dans la littérature pour augmenter la sensibilité de l'étape de détection des produits d'amplification. Nous travaillons actuellement au développement d'un protocole PCR-ELISA performant. Ce test est basé sur la détection, dans une plaque multipuits, des produits d'amplification PCR par une hybridation sandwich [capture

des produits d'amplification par une première sonde (dite "de capture") liée à la plaque de microtitration et révélation colorimétrique de ces derniers à l'aide d'une 2^{ème} sonde (dite "de révélation")] (Lassner et al., 1995; Lage et al., 1996).

Cette technique de révélation sensible (le seuil de détection pour l'ASGV a été estimé à 4 pg de virus) permet d'allier la puissance de l'étape d'amplification. cette technique, qui est également en cours de développement pour l'ACLSV et l'ASPV, permet dès à présent de détecter en moins de 24 heures la présence de l'ASGV à partir d'extraits bruts de tissus ligneux prélevés tout au long de l'année (Daniels et al., 1998), rencontrant ainsi les exigences de sensibilité, de spécificité et de convivialité auxquels doivent satisfaire les tests de diagnostic.

CONCLUSION

Le potentiel d'application des tests de diagnostic doit être évalué en termes de sensibilité, de spécificité et de coût, en relation avec les particularités de chaque problème à résoudre.

La simplicité et la rapidité d'emploi constituent également des critères appréciables dans le choix des méthodes à mettre en œuvre. Si les kits de diagnostic sérologique des agents phytopathogènes connaissent depuis de nombreuses années une commercialisation importante par plusieurs sociétés privées étrangères, les kits basés sur l'hybridation moléculaire ont connu peu de développement commercial dans le secteur agronomique, alors que cette même technologie connaît dès à présent des applications pratiques dans les domaines médical et vétérinaire.

La diffusion de ces techniques moléculaires demande que l'on s'attache à développer des protocoles qui allient simplicité, robustesse, rapidité, sensibilité et spécificité afin de stimuler l'installation de laboratoires agréés pour leur utilisation, de donner une impulsion à leur commercialisation sous forme de kits et de pouvoir ainsi répondre aux besoins exprimés par la profession.

Les progrès réalisés dans le cadre de notre programme avec les techniques moléculaires basées sur la PCR, tant au niveau de la préparation des échantillons (extraction avec silice, immunocapture ou utilisation d'extraits bruts dilués selon les virus) qu'au niveau de la révélation (PCR-

ELISA), rendent réalistes les perspectives d'automatisation de ces techniques et leur utilisation en routine pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Ces protocoles doivent encore être optimisés (meilleure définition des sondes de capture et de révélation, marquage de la sonde de révélation, ...). Par ailleurs, le coût des appareils spécifiquement associés à ces techniques moléculaires (cycleur) diminue et la PCR-ELISA utilise un équipement (lecteur ELISA) largement répandu dans les laboratoires d'analyse utilisant les tests sérologiques. Ces considérations ouvrent des perspectives réalistes d'un coût d'analyse acceptable pour les utilisateurs. Le *tableau 1* compare les performances potentielles des différents tests pour les virus concernés par le programme.

Néanmoins, le marché des trousse de diagnostic moléculaire des agents phytopathogènes devrait concerner en priorité les productions agricoles à haute valeur ajoutée (plantes ornementales et fruitières à multiplication végétative, semences de base, cultures alimentaires présentant un intérêt commercial important comme la pomme de terre, le bananier, etc). Il conviendra cependant de définir les protocoles d'échantillonnage satisfaisant aux standards de qualité tout en étant adaptés aux caractéristiques particulières de ces kits (sensibilité, ...) et aux spécificités des agents pathogènes ciblés (distribution dans l'arbre, tissu à prélever, ..).

BIBLIOGRAPHIE

- Daniels J., Marinho V.L.A., Kummert J. et Lepoivre P. 1998. Development of colorimetric RT-PCR tests for ASGV detection in apple trees. *Acta Horticult.* (in press).
- Kummert J., Marinho V.L.A., Rufflard G., Colinet D. & Lepoivre P. 1998. Sensitive detection of apple stem grooving and apple stem pitting viruses from infected apple trees by RT-PCR. *Acta Horticult.* (in press).
- Kummert J., Rufflard G., Colinet D. & Lepoivre P. 1995a. Detection of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus by RT-PCR and IC-RT-PCR. *Med. Fac. Landbouww. Uni. Gent* 60 (2a), 277-287.
- Kummert J., Colinet D. & Lepoivre P. 1995b. Detection of plant viruses by molecular hybridization using non-radioactive probes. *Bulletin OEPP* 25, 301-313.

- Lage A.P., Fauconnier A., Burette A., Glupczynski Y., Bollen A. & Godfroid E. 1996. Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 530-533.
- Lassner D. 1995. Quantitation of mRNA by the ELISA technique using external standards. Pages 117-123 in *Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction : non radioactive PCR methods*. Kohler Th., Lassner D., Rost A.-K., Thamm B., Pustowitz B. & Remke H., eds Springer Germany.
- Lepoivre P., Kummert J., Colinet D., Duterme O. & Anceau C. 1994. *Techniques moléculaires de détection et d'identification des agents pathogènes*. Cahiers agricultures 3 : 217-225.
- Mallet F., Oriol G., Mary C., Verrier B. & Mandrand B. 1995. Continuous RT-PCR using AMV-RT and Taq DNA polymerase : characterization and comparison to uncoupled procedures. *Bio Techniques* 18 : 678-687.
- Nemeth M. 1986. *Virus, mycoplasma, and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Kluwer Academic Press, Hingham, MA.
- Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M. & Dunez J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 39 : 27-37.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

ARBORICULTURE FRUITIERE

Un nouveau traité d'arboriculture fruitière vient de paraître en Suisse. Réalisé par une équipe de spécialistes œuvrant au sein de la Commission intercantonale romande et tessinoise d'arboriculture, cet ouvrage de 272 pages associe un texte résolument actuel à une abondante illustration par photos, graphiques et schémas.

Après une présentation de l'arboriculture suisse, on envisage successivement :

- le milieu : sol, climat,
- la botanique et la physiologie des arbres,
- la multiplication,
- la conduite et les formes,
- la création d'un verger,
- son entretien : fertilisation — sol — protection phytosanitaire — régulation de la croissance et de la charge en fruits, lutte antigel, irrigation,
- la récolte et la conservation des fruits,
- les espèces à pépins et à noyau,
- l'économie et la gestion.

Ce livre est destiné principalement aux professionnels et aux jeunes arboriculteurs qui suivent une formation spécialisée, mais également à tous les amateurs éclairés ou passionnés d'arboriculture.

Références :

Arboriculture fruitière, 4^e édition: 272 pages
 ISBN 3-906679-58-6
 Vente au prix de 65 F.S. + frais de port.
 Centrale des moyens d'enseignement agricole,
 Länggasse 79,
 CH-3052 ZOLLIKOFEN (Suisse)

A.S.

Conservation et Utilisation des Ressources Phytogénétiques

La conservation des ressources génétiques, et notamment des plantes, est un sujet qui a progressivement attiré l'attention publique, et aussi celle des autorités, au cours des dernières années. Sauf pour certains scientifiques, la conservation génétique est un sujet neuf, qui méritait une clarification quant aux motifs qui l'animent, aux buts qu'elle poursuit et à l'utilité qu'elle présente. Cette clarification est aujourd'hui chose faite, grâce aux exposés de ce colloque qui a eu lieu à Gembloux le 26/3/1997.

Ces exposés sont organisés en deux volets. Le premier volet, concerne l'organisation des activités en matière de ressources phytogénétiques sur le plan mondial, sur le plan de l'Union Européenne, et sur le plan national (exemple de la France).

Le deuxième volet comprend deux exposés à propos de travaux effectués en Belgique sur les ressources génétiques de cultures d'origine tropicale, suivi de trois exposés qui concernent des travaux menés également dans notre pays sur les ressources génétiques d'espèces végétales des régions tempérées, notamment les arbres fruitiers et leur résistance aux maladies (13 p.).

L'ouvrage compte 76 pages et est édité par le Centre de Recherches agronomiques de Gembloux 22, avenue de la Faculté, 5030 Gembloux

Tél.: 081/61 19 55 — Fax : 081/61 49 41

L'ouvrage est disponible au prix de 200 BEF à verser au compte 000-1692586-33

de la Personnalité juridique du CRA, D8 22, avenue de la Faculté, 5030 Gembloux.