



■ LA PROBLÉMATIQUE

L'importance de ralentir la mortalité des cocotiers par phytoplasmes en Afrique

Les phytoplasmes du cocotier en Afrique sont associés à des maladies du type jaunissement mortel et ont été responsables de la mort de nombreux palmiers dans les régions côtières d'Afrique de l'ouest et de l'est. Ces maladies sont également responsables de la destruction des moyens de subsistance de nombreux petits planteurs et de l'effondrement de l'industrie de la noix de coco dans des pays comme le Ghana et le Mozambique. L'épidémie initiale au Ghana a provoqué l'effondrement de l'industrie de la noix de coco dans la région Volta dans les années 1950, et l'épidémie plus récente dans les régions du centre et de l'ouest a tué plus d'un million de cocotiers à ce jour (Eziashi et Omamor, 2010). Les phytoplasmes responsables ont été classés dans le sous-groupe RFLP 16SrXXII-A de '*Candidatus Phytoplasma palmicola*' au Cameroun, au Nigeria et au Mozambique, comme souches liées à 16SrXXII-B '*Ca. P. palmicola*' au Ghana et en Côte d'Ivoire, et le groupe tanzanien pour les phytoplasmes de Tanzanie et du Kenya. Ces phytoplasmes sont différents de ceux associés à la maladie au Mexique et dans les Caraïbes, qui appartiennent tous aux groupes 16SrIV (Harrison *et al.*, 2014).

Des génotypes de cocotiers hybrides résistants et prometteurs ont été identifiés au Ghana pour le phytoplasme 16SrXXII-B, et les seules options actuelles efficaces de gestion de la maladie sont l'abattage rapide et systématique et la destruction par le feu des cocotiers infectés pour éliminer les réservoirs de phytoplasmes, puis la replantation avec de nouveaux palmiers sains. L'un des facteurs qui peut améliorer considérablement le succès d'une telle stratégie est la détection rapide des infections dans les cocotiers, de sorte qu'ils puissent être éliminés avant qu'ils n'aient eu la chance de propager la maladie aux palmiers voisins. Cette fiche d'information détaille le développement et le déploiement d'un système de détection rapide en 20 minutes et sur le terrain du 16SrXXII '*Ca. P. palmicola*' dans les cocotiers en Afrique.



• Cocotiers morts suite à une infection par le 16SrXXII-B '*Candidatus Phytoplasma palmicola*' au Ghana (F. Pilet, CIRAD).



■ DERNIERS RÉSULTATS DE RECHERCHE

Méthode de diagnostic rapide pour lutter contre la dissémination des phytoplasmes du cocotier

Les méthodes de diagnostic pour la détection du phytoplasme des cocotiers utilisées dans le monde entier exigent généralement que des échantillons de carottages de palmiers prélevés sur le terrain soient transportés au laboratoire pour en extraire l'ADN, puis testés par réaction en chaîne par polymérase (PCR) classique avec analyse des résultats par électrophorèse sur gel. En raison de l'éloignement des zones infectées dans de nombreux pays, en particulier en Afrique subsaharienne, cela peut souvent prendre deux jours ou plus entre l'échantillonnage et le résultat final. Il a été démontré que les systèmes de détection par amplification isotherme en boucle (LAMP) sur le terrain sont beaucoup plus rapides que la PCR, avec l'avantage de pouvoir travailler sur des échantillons d'ADN relativement impurs. On a mis au point des appareils LAMP portables, fonctionnant sur batterie, qui peuvent être déployés sur le terrain dans des endroits éloignés et qui affichent les résultats de la détection des produits de réaction LAMP en 15 à 20 minutes. En outre, des mélanges de réactifs LAMP ont été mis au point, ils sont stables à la température ambiante pendant au moins un mois, de sorte qu'ils peuvent être facilement transportés vers ces sites éloignés.



- Collecte d'échantillons par perçage de tronc de cocotiers pour l'extraction d'ADN sur le terrain au Ghana.



■ L'ACTIVITÉ RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT TROPICSAFE

La contribution de TROPICSAFE à l'amélioration des systèmes de détection LAMP sur le terrain

L'objectif des travaux au sein de TROPICSAFE est de concevoir et de valider des amorces spécifiques pour les phytoplasmes du cocotier, qui puissent ensuite être incorporées aux mélanges réactionnels des systèmes LAMP de détection des maladies du cocotier sur le terrain, ainsi que de développer et valider un système d'extraction rapide d'ADN à partir de prélèvements de tronc qui puisse être entrepris avec un équipement minimal. L'objectif global est de développer et de valider un système capable de détecter la présence de phytoplasmes de façon spécifique dans les cocotiers en 20 minutes, du début à la fin, dans des endroits éloignés et avec un équipement minimal.

Les amorces LAMP ont été conçues à partir de la séquence du gène *leuS* de '*Ca. P. palmicola*' et sont capables de détecter les phytoplasmes des groupes 16SrXXII-A et 16SrXXII-B en 15-20 minutes avec le système de diagnostic LAMP. Ces amorces ont été validées sur des échantillons prélevés au Ghana, au Nigeria et au Mozambique, et il a également été démontré qu'elles n'avaient aucune réaction croisée avec les ADNs des phytoplasmes du cocotier en Tanzanie, les ADNs de phytoplasmes 16SrIV-A (jaunissement mortel du cocotier) des Etats-Unis et du Mexique, de phytoplasmes 16SrIV-D du cocotier au Mexique, ou de phytoplasmes de tous les autres groupes taxonomiques testés (16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrIX, 16SrX, 16SrXI et 16SrXIV). De plus, une procédure d'extraction d'ADN basée sur la méthode PEG alcaline de Chomczynski et Rymaszewski (2006) a été validée, dans laquelle 10 à 20 mg de sciure de tronc de cocotier sont placés directement depuis le forêt dans 500 µl de tampon PEG alcalin et écrasés pendant 30 secondes avec un micropilon en plastique jetable. Un microlitre du surnageant est ensuite utilisé directement dans la réaction LAMP, et pour confirmer que la qualité d'ADN extrait convient à la LAMP, un deuxième ensemble d'amorces a également été développé pour détecter le gène de la cytochrome oxydase du cocotier.



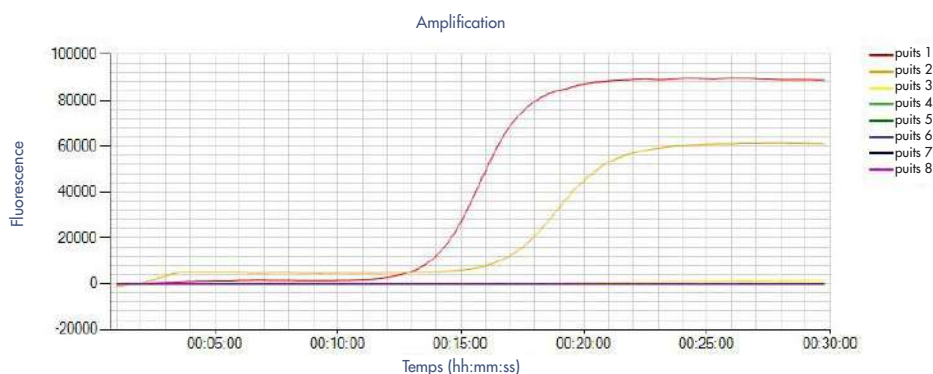
- Développement d'un diagnostic LAMP avec des équipements portables pour l'extraction d'ADN et la détection de phytoplasmes sur le terrain.



■ DONNÉES SCIENTIFIQUES ET PREMIERS RÉSULTATS

Premiers essais sur le terrain au Ghana et potentiel pour les Caraïbes et l'Amérique

Un test de diagnostic LAMP pour une utilisation sur le terrain a été mis au point pour la détection rapide et spécifique des phytoplasmes du groupe 16SrXXII responsable du jaunissement mortel du cocotier en Afrique. Ce test a été combiné à un système d'extraction rapide d'ADN qui utilise un équipement minimal permettant de tester des échantillons de 10 à 20 mg de sciures obtenues par carottage de tronc de palmiers individuels sur le terrain, et de confirmer les résultats dans les 20 à 30 minutes suivant l'extraction. En effet, chaque échantillon de carottage de tronc est testé avec deux ensembles d'amorces simultanément dans la machine portable LAMP, l'un pour l'ADN du phytoplasme 16SrXXII, et l'autre pour l'ADN du cocotier. Par conséquent, tout échantillon qui donne des résultats positifs avec les amorces de phytoplasme peut être considéré comme positif pour la présence du phytoplasme, tandis que tout échantillon qui donne des résultats négatifs avec les amorces de phytoplasme mais positifs avec les amorces de cocotiers peut être considéré comme négatif pour la présence de niveaux détectables de phytoplasme et donc très probablement non contaminé. Tout échantillon qui donne des résultats négatifs avec les deux séries d'amorces est considéré comme contenant des inhibiteurs des enzymes de réaction LAMP (ou ne contenant pas d'ADN) et devrait être testé à nouveau après une nouvelle extraction d'ADN. La méthode a été testée sur le terrain au Ghana et avec des échantillons de sciures de tronc qui avaient été envoyés et stockés à l'Université de Nottingham, au Royaume-Uni. En outre, un ensemble distinct d'amorces a été mis au point pour la détection spécifique des phytoplasmes des sous-groupes 16SrIV-A et 16SrIV-D du cocotier, qui peuvent être détectés rapidement sur le terrain dans les cocotiers des Caraïbes et des Amériques, où ces phytoplasmes sont ceux associés au jaunissement mortel du cocotier.



- Un profil de détection LAMP pour les phytoplasmes du groupe 16SrXXII. Les puits 1 et 2 montrent des réactions positives de palmiers infectés par le phytoplasme tandis que les puits 3-7 montrent des réactions négatives, le puit 8 est de l'eau de contrôle.

MOTS CLÉS

LAMP, maladies du jaunissement mortel, détection au champs, phytoplasme

INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Chomczynski P., Rymaszewski M. 2006. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *BioTechniques* 40, 454-458.

Eziashi E., Omamor I. 2010. Lethal yellowing disease of the coconut palms (*Cocos nucifera* L.): an overview of the crises. *African Journal of Biotechnology* 9, 9122-9127.

Harrison N., Davis R.E., Oropeza C., Helmick E., Narvaez M., Eden-Green S., Dollet M., Dickinson M. 2014. '*Candidatus* Phytoplasma palmicola', a novel taxon associated with a lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1890-1899.

CRÉDITS

Matthew Dickinson Université de Nottingham, École de Biosciences, Nottingham, Royaume-Uni matthew.dickinson@nottingham.ac.uk

Ndede Yankey Conseil du Programme de Recherche Scientifique-Institut de Recherche sur le Palmier à Huile, Sekondi, Ghana
ndedeyankey@yahoo.com

Février, 2019



Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne en vertu de la convention de subvention N° 727459

www.tropicsafe.eu

Cette fiche d'information est produite dans le cadre du projet TROPICSAFE. Bien que l'auteur ait travaillé sur la meilleure information disponible, ni l'auteur ni l'UE ne sont en aucun cas responsables des pertes, dommages ou préjudices subis directement ou indirectement en rapport avec le projet.