



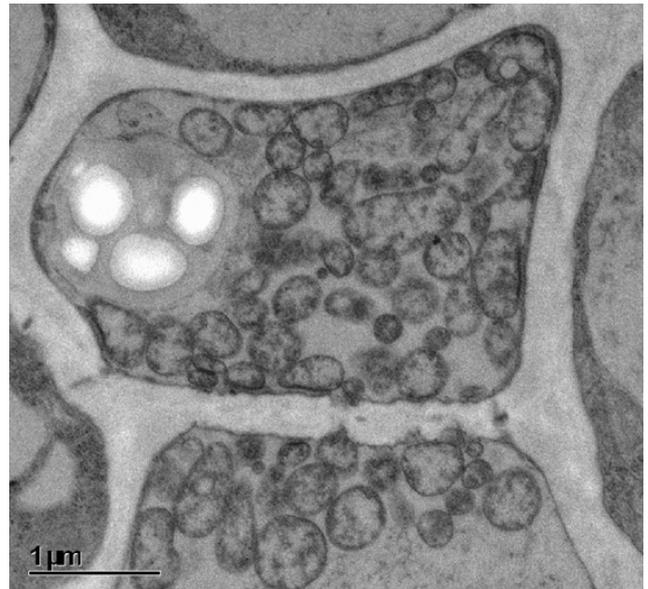
■ LA PROBLÉMATIQUE

Absence de matériel bien caractérisé et certifié pour l'utilisation comme témoins positifs de référence de phytoplasmes

L'important secteur économique de la vigne représente une production mondiale de 74 millions de tonnes, et est menacé par plusieurs maladies de type jaunissements de la vigne associées à la présence de phytoplasmes. Il y a actuellement un manque de disponibilité de matériels bien caractérisés et certifiés pouvant servir de témoins positifs de référence dans différents systèmes de diagnostic, études de validation, études de performance des tests et tests de compétence, qui font tous partis du programme de gestion de la maladie par une détection rapide et précise des phytoplasmes responsables des jaunissements de la vigne.

'*Candidatus Phytoplasma solani*' associé au bois noir, la maladie de la vigne la plus répandue dans le bassin euro-méditerranéen, a été choisi comme modèle. Au cours des 20 dernières années, le bois noir est devenu un facteur limitant majeur de la viticulture européenne, qui affecte sérieusement la qualité et la quantité de la production viticole avec des taux d'infection atteignant 50-80% dans certaines zones. En Afrique du Sud, les jaunissements de la vigne sont associés à la présence de '*Ca. P. asteris*' alors qu'au Chili et d'autres pays plusieurs phytoplasmes sont présents.

Des méthodes moléculaires sont nécessaires pour détecter la présence de '*Ca. P. solani*' ou '*Ca. P. asteris*' présents en faibles concentrations dans de nombreux échantillons et la PCR quantitative (qPCR) est une méthode couramment utilisée. La qPCR donne un résultat numérique qui reflète la concentration de la cible dans l'échantillon. Cependant, ces valeurs numériques dépendent également des réactifs spécifiques, de leurs concentrations et de l'instrument utilisé. Les résultats obtenus dans différents laboratoires ne sont donc pas directement comparables. Un matériel de référence peut être utilisé comme point fixe dans toutes les études et recherches, ce qui rend les résultats directement comparables entre laboratoires et, plus important encore, dans le temps. Les matériels de référence certifiés ne sont pas disponibles pour les agents pathogènes des plantes. Pour surmonter cette difficulté, nous avons préparé deux types de matériels de référence pour les phytoplasmes pathogènes de la vigne.



• Image au microscope électronique à transmission de la coupe transversale de la nervure principale de *Catharanthus roseus* symptomatique infecté par '*Ca. P. solani*' (M. Tušek Žnidarič).

■ LA PRATIQUE / INNOVATION PROPOSÉE PAR TROPICSAFE

Deux nouveaux matériels de référence pour les phytoplasmes de la vigne

Deux types de matériels de référence ont été préparés:

1) les séquences d'ADN de la région cible utilisée pour la PCR quantitative décrite initialement par Hren *et al.* (2007), ainsi que les données nucléotidiques disponibles auprès du NCBI, ont été utilisés pour définir l'ADN synthétique, par exemple gBlocks, IDT. L'ADN double brin synthétique de taille et de quantité déterminée est bon



marché et fournit des quantités élevées de la séquence cible spécifique et est approprié comme témoin positif pour l'évaluation technique et comme contrôle positif dans les tests;

2) des ADN en collection de vigne infectée naturellement par 'Ca. P. solani' ont été sélectionnés et des protocoles de quantification par PCR digitale en gouttelettes ont été conçus pour attribuer des valeurs de référence aux concentrations des séquences cibles. Cette méthode permet une quantification absolue sans avoir besoin de standards et d'étalonnages.

■ COMMENT CELA EST-IL MIS EN OEUVRE DANS TROPICSAFE ?

Utilisation de données de séquence publiques et caractérisation du matériel par PCR digitale en gouttelettes

La préparation du matériel de référence est un processus difficile qui exige une grande précision et qui est particulièrement exigeant et chronophage puisque la croissance des phytoplasmes en milieux artificiels n'est pas encore une méthode de routine. Les deux types de matériels de référence préparés dans le cadre du projet TROPICSAFE sont les conditions préalables à la poursuite des études sur la vigne infectée par 'Ca. P. solani' ou par 'Ca. P. asteris' qui nécessitent des contrôles positifs de référence. Les deux approches pour la préparation du matériel de référence sont facilement transférables à d'autres phytoplasmes et cibles d'ADN. De plus, ils ont été utilisés pour attribuer des valeurs à des matériels de référence utilisés dans des essais internationaux de compétence organisés par l'Institut National de Biologie (Slovénie) pour différents organismes nuisibles.

Le premier matériel de référence est basé sur l'ADN synthétique double brin, pour lequel les données de séquences accessibles au public ont été utilisées. Les tailles et quantités connues permettent de préparer des matériels de références avec une concentration de la séquence cible relativement bien définie, et ne nécessitent pas d'essais supplémentaires.

Le deuxième matériel de référence, correspondant mieux aux échantillons diagnostiqués, est basé sur des échantillons d'ADN provenant de nervures de feuilles de vigne infectées par 'Ca. P. solani'. Les valeurs de référence des concentrations de la séquence cible ont été attribuées après la caractérisation du matériel de référence à l'aide de la PCR digitale en gouttelettes, une référence pour la quantification absolue.

```
> gBlock control on KT281865.1 Candidatus Phytoplasma solani isolate STOL3 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene, partial cds
ACGTAAAACAGCTTTAAGTTTAATAAAGGCAATTCCAAAGTAAAAGCAGGTTTAGCGATG
GTTGTTTTTCCTGAAGGTGGTATTAAAGATCGAAATGATGAAGCAACGGTACCACTTTTAG
AGGGGTCTTTTAAATTGCTTTTAAAACGCAAGCCGA
```

- Séquence de l'ADN synthétique témoin proposé pour être la cible amplifiée par qPCR pour le 'Ca. P. solani'. Les zones grisées correspondent aux sites d'hybridation des amorces et de la sonde, site reconnu par les réactifs utilisés pour détecter l'agent pathogène.



■ COMMENT ÇA MARCHE ?

Potentiel des témoins positifs de référence et de leur transfert à d'autres phytoplasmes et cibles d'ADN

Avec un matériel de référence avec de l'ADN synthétique, l'un des inconvénients potentiels est que l'ADN synthétisé est spécifique d'une cible et donc d'une séquence spécifique au test, sa taille et sa quantité connues permettent la préparation d'un matériel de référence avec une concentration cible relativement bien définie sans test supplémentaire. En fonction de la séquence cible choisie, ce matériel de référence peut être commandé commercialement, ce qui constitue un avantage important de cette approche.

Du matériel végétal naturellement infecté par '*Ca. P. solani*' a été caractérisé par PCR digitale en gouttelettes qui est la meilleure méthode dans les domaines de la métrologie clinique pour la quantification absolue des concentrations cibles sans un besoin d'étalonnage. Pour la préparation du matériel de référence, un protocole qPCR actuel a été transposé avec succès au format de la PCR digitale en gouttelettes et utilisé pour déterminer la concentration absolue des copies d'ADN cibles dans les échantillons. Le protocole peut être utilisé pour attribuer des quantités à des échantillons infectés naturellement ou à des mélanges définis et préparés artificiellement.

Les deux types de matériels de référence décrits ici conviennent à l'objectif visé. Un matériel de référence dont la concentration de la cible est connue et permet d'assurer la comparaison au fil des essais et, plus important encore, au fil du temps, puisqu'ils peuvent être préparés de façon répétée avec les mêmes caractéristiques. L'approche décrite est transférable à d'autres phytoplasmes et cibles ADN.

	ds-ADN synthétique (gBlock)	Échantillons naturellement infectés
P R O S	<ul style="list-style-type: none"> Grande quantité d'ADN cible Concentration de la cible bien définie Disponible commercialement Tests comparable 	<ul style="list-style-type: none"> similaire aux échantillons diagnostiqués Plus commutable Peut être utilisé dans une variété de tests moléculaires Fournit des informations sur l'influence de l'isolement de l'ADN
C O N S	<ul style="list-style-type: none"> Spécifique à la séquence L'isolement de l'ADN n'est pas nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> Quantités et disponibilité limitées isolement de l'ADN nécessaire

- Caractéristiques des deux types de matériels de référence préparés pour l'agent '*Ca. P. solani*' responsable de la maladie du bois noir.

MOTS CLÉS

Matériel de référence, détection, agent pathogène de plante, PCR digitale en gouttelettes

INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES

Dreo T., Alič Š., Mehle N., Dermastia M. 2018. Preparation of defined reference material for molecular testing of "bois noir" phytoplasma. Proceedings of the 5th European Bois noir workshop, Ljubljana 2018. <https://www2.cd-cc.si/Skripte/boisn/BOISNOIR2018/papers/a29.pdf>

Dreo T., Pirc M. 2019. Final report on the NIB Proficiency Test Round 2018-01: proficiency test for the molecular detection of *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). Ljubljana: National Institute of Biology. 20 pp.

Hren M., Boben J., Rotter A., Kralj P., Gruden K., Ravnikar M. 2007. Realtime PCR detection systems for "flavescence dorée" and "bois noir" phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56, 785-796.

CRÉDITS

Tanja Dreo tanja.dreo@nib.si, Špela Alič spela.alic@nib.si, Marina Dermastia marina.dermastia@nib.si
Institut National de Biologie, Département de Biotechnologie et de Biologie des Systèmes, Ljubljana, Slovénie

Mars, 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.