

# Amplification isotherme



## Coût\*

\* aucune donnée disponible quant au coût

## Délai

30-40 min\*

\*délai moyen d'obtention des résultats des kits

## Fiabilité

3,5\*

\*établie selon une échelle relative en fonction des autres techniques

AVANTAGES

- Détection d'agents pathogènes avant apparition des symptômes
- Pas d'étape de purification du matériel génétique
- Réalisable sur le site de prélèvement
- Ne nécessite pas d'appareil coûteux

INCONVÉNIENTS

- Détection d'ADN/ARN libre (cellules lysées, organismes morts)
- Risque de contamination par d'autres ADN/ARN

## PRINCIPE

Il s'agit d'un ensemble de méthodes permettant de détecter un agent pathogène responsable d'une maladie. Elles sont parfois qualifiées de PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) isothermes. Ces méthodes partagent avec la PCR l'amplification spécifique d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (ADN/ARN) par une ADN/ARN polymérase. La présence d'un bioagresseur implique la présence de son matériel génétique (ADN et ARN). Ce matériel étant propre à chaque organisme, il va servir de cible pour l'amplification.

L'amplification isotherme permet d'identifier l'ADN ou l'ARN du virus, de la bactérie, du champignon ou du phytoplasme phytopathogène recherché. L'amplification spécifique d'un acide nucléique est qualifiée d'isotherme puisqu'elle se fait à une température constante.

Les méthodes d'amplification isotherme peuvent être utilisées en laboratoires ou déclinées sous forme de kits de détection utilisables directement sur la parcelle.

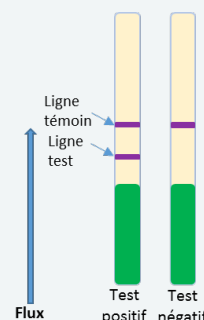
## Protocole de prélèvement des échantillons

- Prélever les organes suspectés malades et les stocker dans des sachets
- Annoter soigneusement les sacs individuellement
- Conserver au frais (4°C) et envoyer le plus vite possible (dans les 24h suivant le prélèvement)
- Préférer un envoi en début de semaine, par transporteur rapide, pour éviter le stockage durant le weekend

Contactez un laboratoire proposant ce service pour déterminer le type d'échantillon (nombre, nature...), le meilleur moment de prélèvement et les informations complémentaires à envoyer (état de la parcelle, itinéraires techniques...)

## Protocole des kits de terrain

Les échantillons sont broyés dans un sachet spécial contenant un tampon d'extraction. Une partie du jus d'extraction est récupéré et placé dans un tube contenant les réactifs (préalablement réhydraté), ce tube va ensuite être placé dans un bloc chauffant portatif. Ce bloc va permettre de maintenir le milieu réactionnel à une température donnée pendant 20-30 minutes. Le tube est ensuite placé dans une chambre de réaction qui va permettre de révéler les résultats, lesquels pourront être lu sur une bandelette.



# Amplification isotherme

L'amplification isotherme regroupe un grand nombre de méthodes. Les plus utilisées pour détecter des bioagresseurs sont les méthodes LAMP et RPA.

- La méthode LAMP (Loop-Mediated Amplification), présente des niveaux d'amplification qui approchent ceux de la PCR classique. Elle présente un très haut niveau de spécificité, lié à l'utilisation de 6 amorces. Cette méthode d'amplification est en générale très rapide.

- La méthode RPA (Recombinase Polymerase Amplification) est une méthode d'amplification isotherme réalisée à basse température Cette méthode s'appuie sur l'utilisation de complexes formées par des amorces oligonucléotidiques et une recombinaise permettant de faciliter l'hybridation des amorces. Cette méthode est notamment utilisée pour les kits de terrain.

## LAMP

Température comprise entre 60-65°C

Pas d'étape de purification et de dénaturation de la séquence nucléique cible

1. Hybridation avec 3 amorces sens suivie d'une élongation
2. Hybridation du nouveau brin avec 3 amorces anti-sens suivie d'une élongation
3. Révélation

Comme pour la PCR, il existe plusieurs déclinaisons de cette méthode : la LAMP classique, la LAMP en temps réel, la RT-LAMP ou encore la RT-LAMP en temps réel.

## RPA

Température comprise entre 37-39°C

Pas d'étape de purification et de dénaturation de la séquence nucléique cible

1. Formation d'un complexe entre les amorces oligonucléotidiques et des recombinaises
2. La recombinaise va permettre l'hybridation des amorces avec l'acide nucléique
3. Elongation
4. Révélation

Cette méthode est facilitée par des protéines capables de se lier à l'ADN simple brin pour le stabiliser.

### Révélation des produits d'amplification de la LAMP

Cette méthode génère des sous-produits. Ils forment un précipité blanc qui augmente la turbidité de la solution. La détection de l'amplification peut donc être réalisée par un grand nombre de méthodes telles que l'électrophorèse, la détermination turbidimétrique, des méthodes électrochimiques ou simplement colorimétriques (par exemple *via* l'utilisation de SybrGreen).

### Révélation des produits d'amplification de la RPA

Il existe un grand nombre de méthodes permettant la révélation des produits d'amplification. Le plus souvent elles sont basées sur la fluorescence, par l'utilisation de sondes ou d'agents intercalants.