

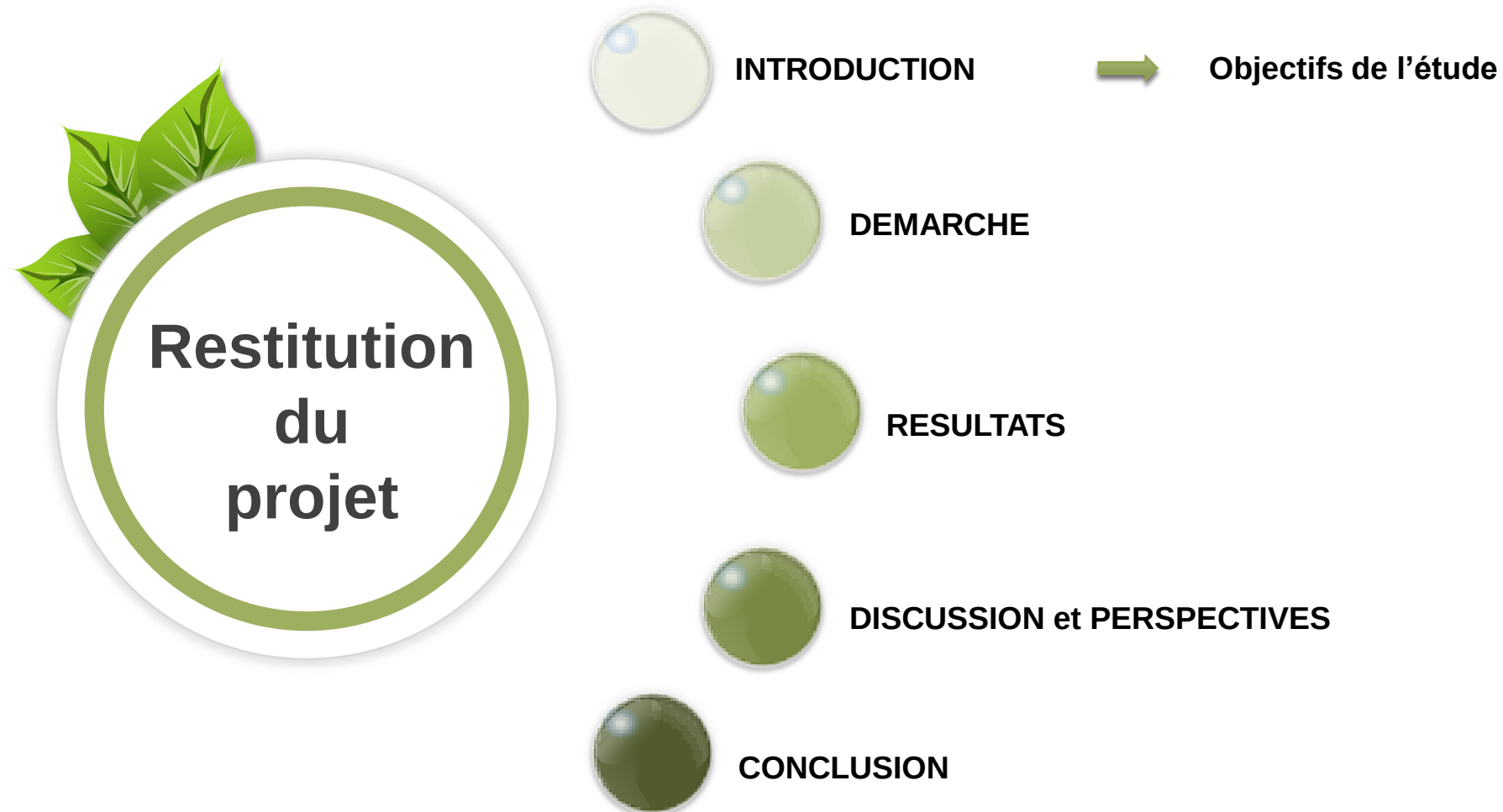
COMMUNICATION AUTOUR DES OUTILS DE DIAGNOSTIC ET DE DÉTECTION DES BIOAGRESSEURS SUR TOUTES CULTURES

**Clémence MAILLOT, Gaëtan MURARD,
Noémie DARLOY, Agathe DUTT, Cloé FRICAN,**

Professeur référent : Emile Benizri

Projet commandité par le GEVES dans le cadre du RFSV, référent : Mathieu Rolland

ORGANISATION DE LA PRÉSENTATION



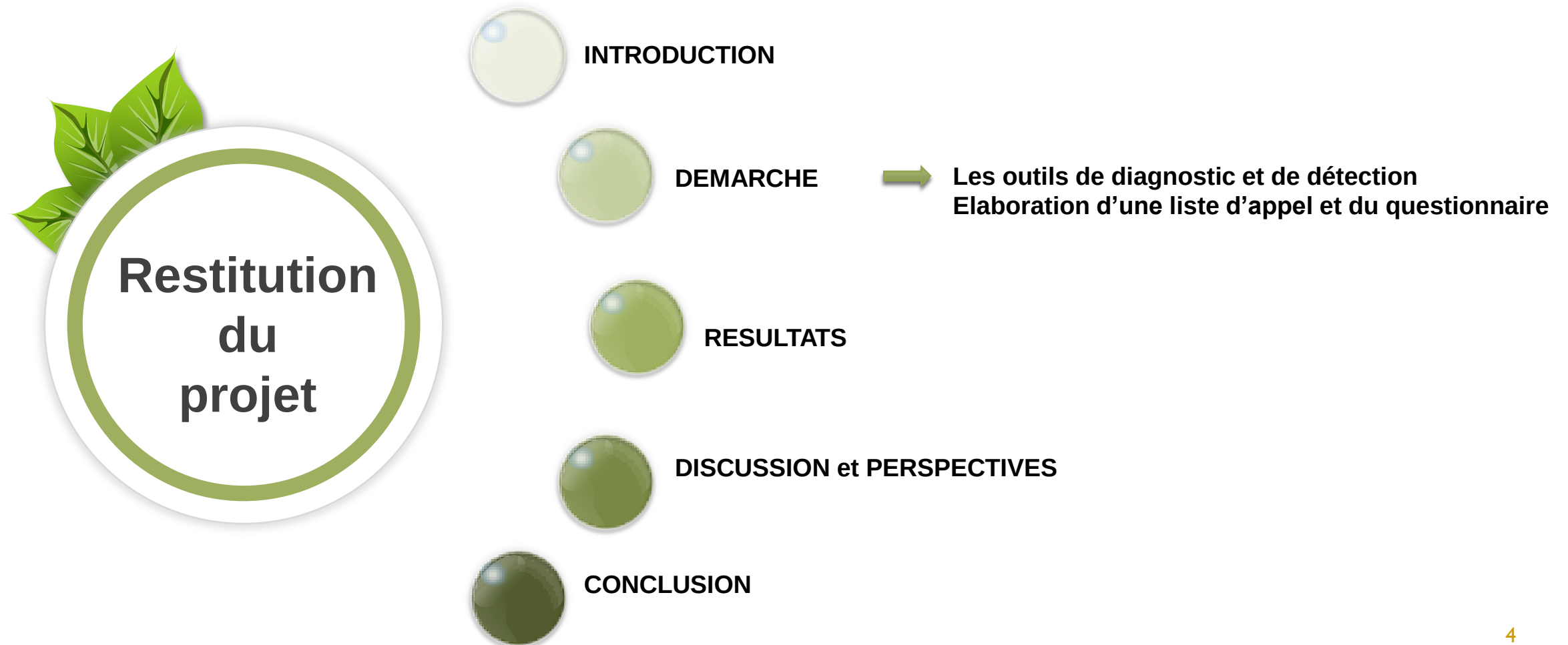
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

REALISER DES FICHES TECHNIQUES AUTOUR DES OUTILS DE DIAGNOSTIC ET DE DETECTION

Réalisation d'un état des lieux des outils utilisés et proposés par différentes structures pour toutes les cultures

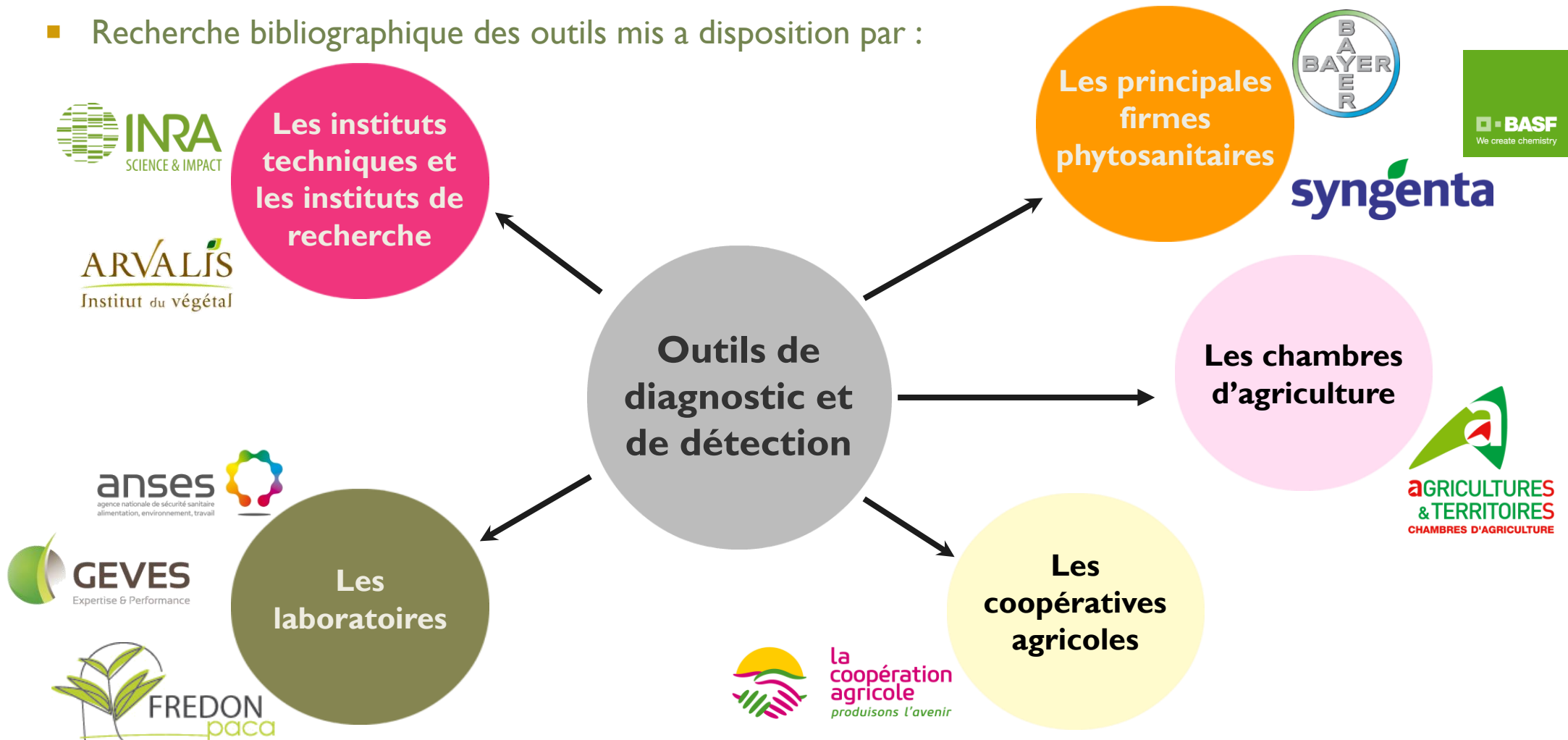
Actualisation de la liste préalablement établie par le RMT (référencement en interne)

ORGANISATION DE LA PRÉSENTATION



RECHERCHE PRÉALABLE AUTOUR DES OUTILS DE DIAGNOSTIC ET DE DÉTECTION

- Recherche bibliographique des outils mis a disposition par :



CONCLUSION DE LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

→ Résultats de cette première recherche :



Informations disponibles

Peu d'information autour de ces outils (contrairement aux OAD)



Outils disponibles

Firme et instituts : fiches de diagnostic visuel, applications Smartphone



Accessibilité

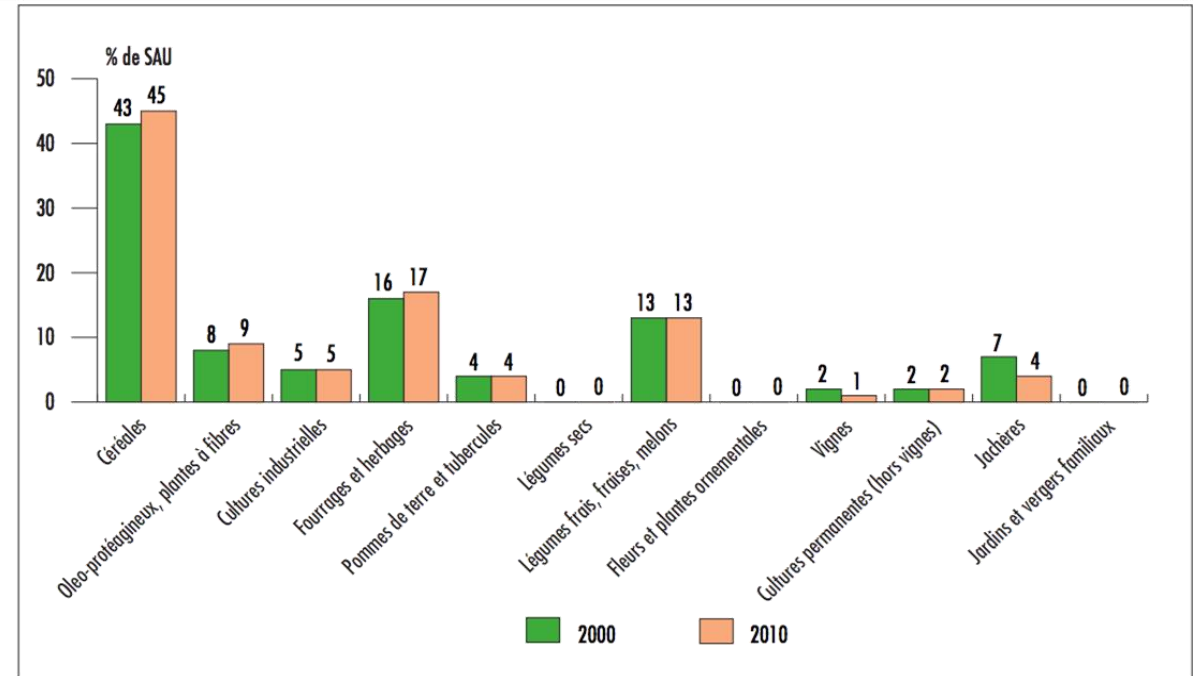
Les outils ne sont pas toujours facilement accessibles (Arvalis)

- Certaines méthodes ont pu être listées : ELISA, PCR...

ÉLABORATION DE LA LISTE D'APPELS

- Les types de cultures considérés :

- Grandes cultures
- Viticulture
- Horticulture
- Maraichage
- Arboriculture



Champ : France métropolitaine

Cultures permanentes (hors vignes) : vergers, pépinières et autres cultures pérennes hors vignes

Source : Agreste - Recensements agricoles 2000 et 2010

→ **Elaboration d'une liste d'appel : 89 structures**

EVOLUTION DE LA LISTE D'APPEL

Temps $t = 0$

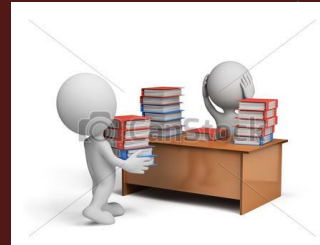


26 laboratoires
répertoriés

Temps $t =$ Enquête



105 services contactés



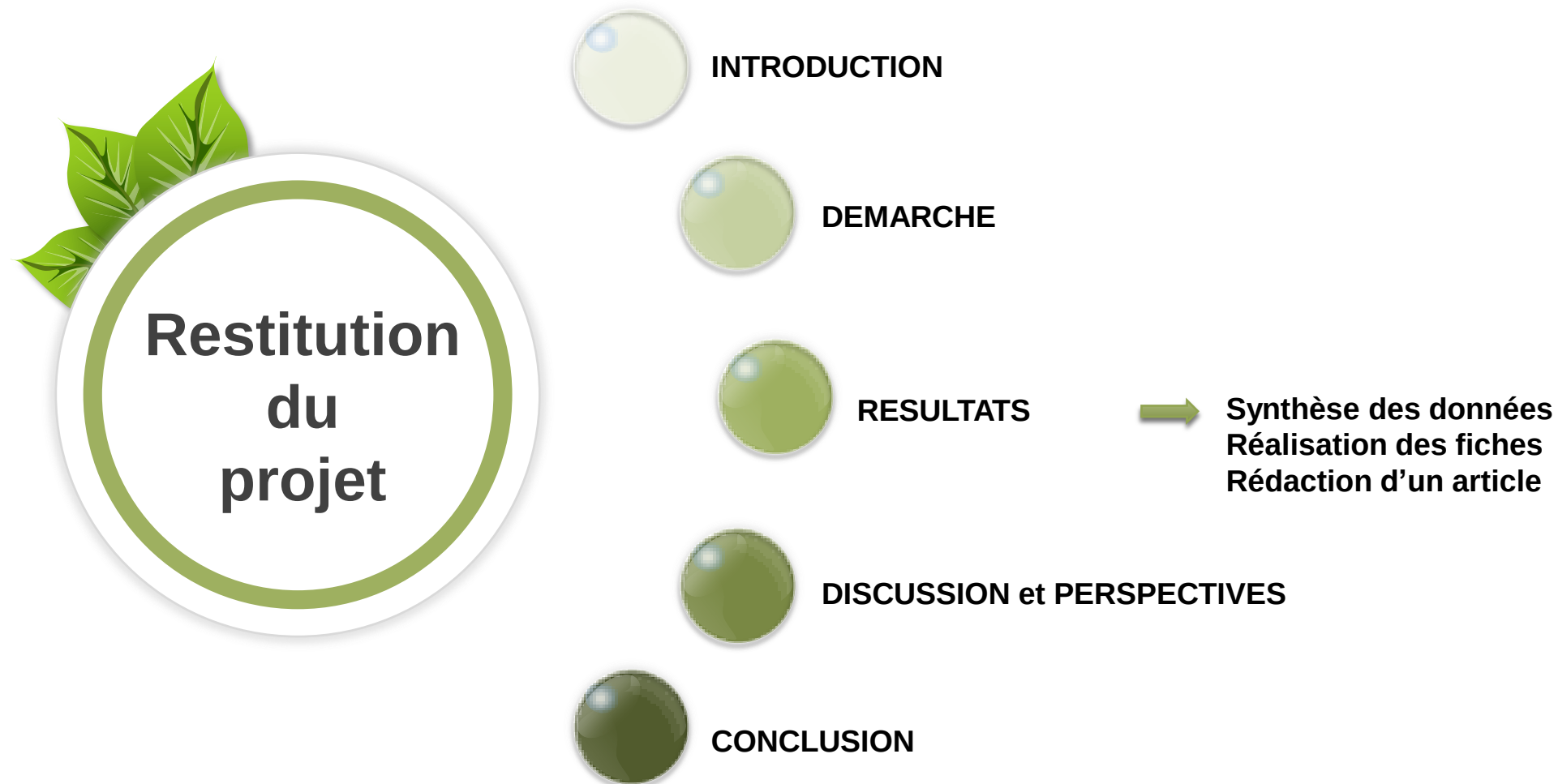
Annuaire complété
/!\ liste non exhaustive

Temps $t = 5$ mois



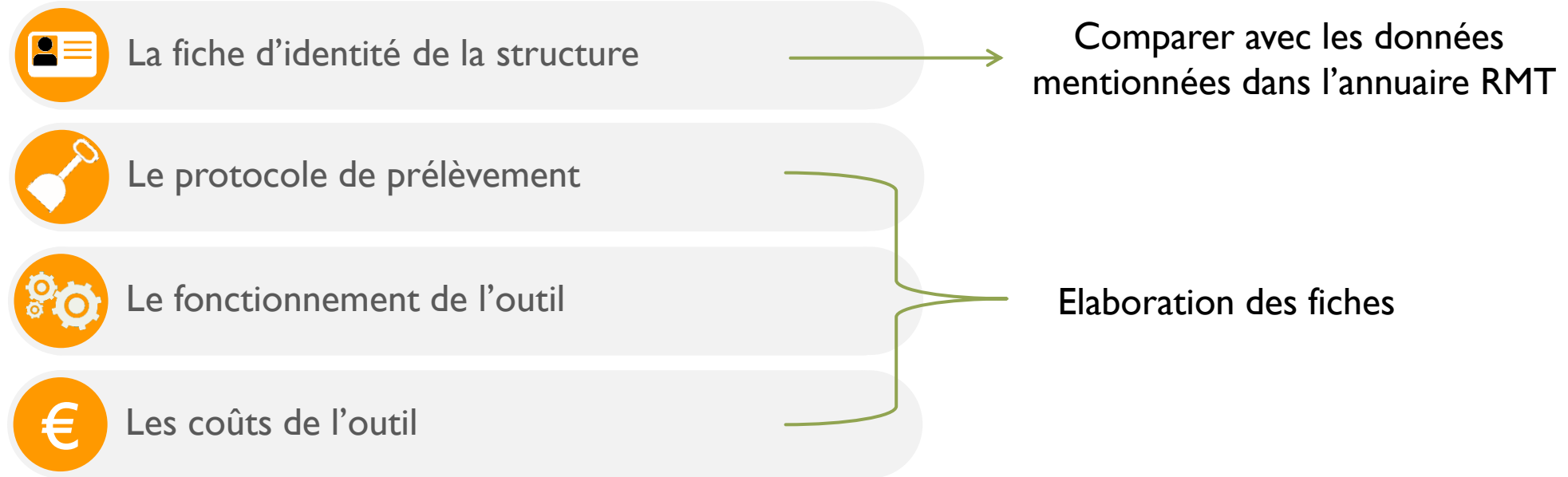
39 structures =
26 laboratoires – 2 (plus
d'outils) + 1 nouveau
laboratoire + 7 autres
structures nouvelles + 8
potentielles

ORGANISATION DE LA PRÉSENTATION



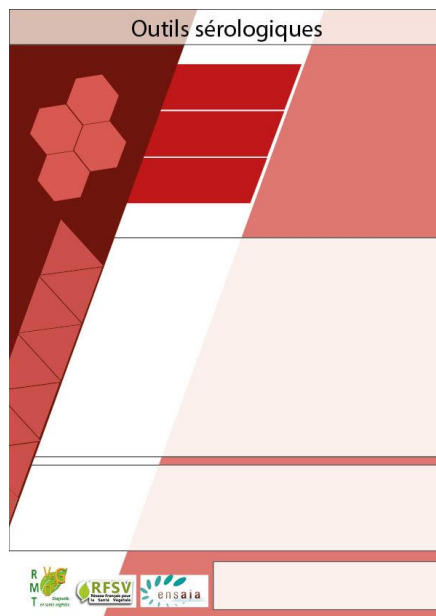
QUESTIONNAIRE

- Les différents thèmes abordés dans le questionnaire :



MISE EN FORME DES FICHES

- Création de 17 fiches techniques + 1 fiche générale
- Utilisation de Indesign
- Réalisation des fiches avec des masques de couleurs différentes
- Catégorisation selon un code couleur



Méthodes de diagnostic et de détection

Diagramme des méthodes de diagnostic et de détection. Le diagramme est composé de formes géométriques (hexagones, triangles) en vert, rouge, bleu, et blanc. En haut à gauche, il y a des logos : R M T, RFSV, et ensaia.

PRINCIPE : LA METHODE DE DIAGNOSTIC

Une méthode de diagnostic suppose que le responsable des symptômes observés ne soit pas identifié. Même si, à partir de ces symptômes, l'observateur soupçonne une catégorie de bioagresseur (champignon, bactérie, arthropode, nématode ou virus), il n'est pas en mesure d'en donner l'identification exacte. Le diagnostic a pour but de tester plusieurs hypothèses afin de déterminer précisément le responsable des symptômes.

Un test de diagnostic est plus large qu'un test de détection et le précède généralement. En effet, une fois l'agent pathogène diagnostiqué, un test de détection, plus précis, permet de confirmer la présence de celui-ci et de valider le diagnostic. Dans le cas de nématodes ou d'arthropodes, un test de diagnostic basé sur une méthode de reconnaissance visuelle est souvent suffisant pour identifier le responsable des symptômes.

PRINCIPE : LA METHODE DE DETECTION

Une méthode de détection suppose d'avoir posé une hypothèse sur l'identité de l'agent pathogène suspecté. Le bioagresseur supposé responsable des symptômes observés est connu, et le test vise à déterminer s'il est bien présent, ou non, dans la plante ou son environnement direct. Ces tests sont spécifiques et souvent précis. Ils permettent de valider l'hypothèse initiale qui découle soit d'un diagnostic soit d'une simple observation des symptômes, si ceux-ci sont facilement reconnaissables et caractéristiques de l'agent.

Protocole de prélèvement des échantillons

Il est toujours basé sur un envoi précautionneux des échantillons contaminés, bien que l'emballage et la nature des organes à envoyer soient variables selon le test à réaliser.

En général, il est préconisé de :

- Prélever les organes suspectés malades et les stocker dans des sachets non comprimés ou du papier journal
- Annoter soigneusement et individuellement les échantillons
- Conserver au frais et envoyer le plus vite possible (dans les 24 heures suivants le prélèvement)
- Préférer un envoi en début de semaine, par transporteur rapide, pour éviter le stockage dans de mauvaises conditions 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...)

Méthodes de diagnostic recensées dans les fiches

- Indexage biologique
- Utilisation du postulat de Koch
- Mise en chambre humide
- Milieux sélectifs et tests biochimiques
- MALDI TOF
- Séquençage
- Applications Smartphone
- Identification morphologique des nématodes
- Identification morphologique des arthropodes
- Barcoding

Méthodes de détection recensées dans les fiches

- Test ELISA
- Immunofluorescence
- Méthode du flux latéral
- Potentiel nécrotique racinaire
- PCR
- Amplification isotherme
- Pucés à ADN

TECHNIQUES RÉPERTORIÉES SUITE À L'ENQUÊTE

Techniques de diagnostic		Techniques de détection	
Chambre humide	Observation visuelle	Test ELISA	Potentiel nécrotique racinaire
MALDI TOF	Indexage biologique	Flux latéral	Immunofluorescence
Postulat de Koch	Identification des arthropodes	PCR	Puce à ADN
Milieux sélectifs et tests biochimiques	Identification des nématodes	Amplification isotherme	
Séquençage	Barcoding		

MISE EN FORME DES FICHES

A

Cultures concernées et bioagresseurs

B

Coût, délai, fiabilité

C

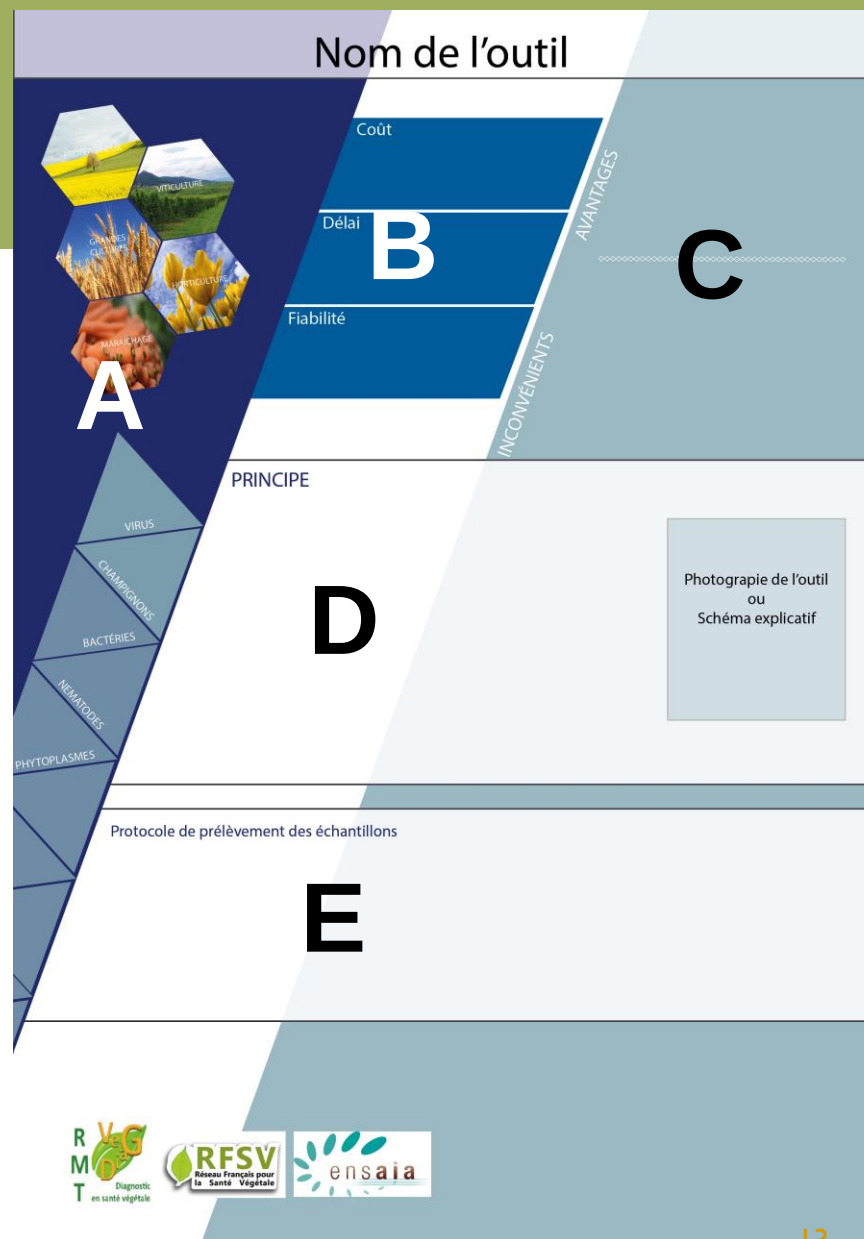
Avantages/Inconvénients

D

Principe de la technique

E

Protocole de prélèvement



PCR - Polymerase Chain Reaction



Coût
**30 - 60 €*
*par pathogène**

Délai
**1 à 2 jours*
*délai de réponse du laboratoire :
8 à 15 jours ouvrés**

Fiabilité
**4,5*
*établie selon une échelle relative
en fonction des autres techniques**

AVANTAGES

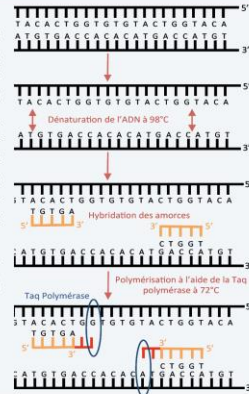
- Quantification parfois possible
- Détection d'agent pathogène avant l'apparition des symptômes

INCONVÉNIENTS

- Détection d'ADN/ARN libre (cellules lysées, organismes mort)
- Prix pouvant être plus élevé pour certains micro-organismes
- Risque de contamination par d'autres ADN/ARN

PRINCIPE

C'est une technique permettant de détecter un agent pathogène responsable de la maladie. La présence d'un organisme cible se traduit dans cette méthode par l'amplification spécifique d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (ADN/ARN). La PCR permet la détection d'une séquence cible d'ADN ou ARN d'un virus, d'une bactérie ou d'un champignon phytopathogène recherché. La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) repose sur l'amplification spécifique d'une séquence d'acide nucléique *in vitro*. Chaque cycle de PCR s'effectue en 3 étapes : dénaturation thermique de l'ADN à 95°C, hybridation des amorces à



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 suivants 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...)



PCR - Polymerase Chain Reaction

Différents types de PCR

- La PCR en temps réel est basée sur une PCR classique mais une mesure de l'amplification est réalisée tout au long de la réaction d'où le terme « en temps réel ». Elle est pseudo-quantitative contrairement à la PCR classique.
- La RT-PCR permet de travailler à partir d'ARN qui est rétrotranscrit par une transcriptase inverse en ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est utilisé pour réaliser une PCR.

PCR

1. Cycle PCR
 - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
 - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
 - Elongation à 72°C
2. Electrophorèse
3. Révélation UV

PCR en temps réel

1. Cycle PCR
 - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
 - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
 - Elongation à 72°C
2. Révélation en temps réel par une sonde fluorescente
3. Résultats et quantification

RT-PCR

1. Transcription inverse : ARN en ADNc
2. Cycle PCR
 - Dénaturation thermique de l'ADN à 95°C.
 - Hybridation des amorces à 50°C-65°C
 - Elongation à 72°C
3. Electrophorèse
4. Révélation UV

Révélation des produits d'amplification de la PCR

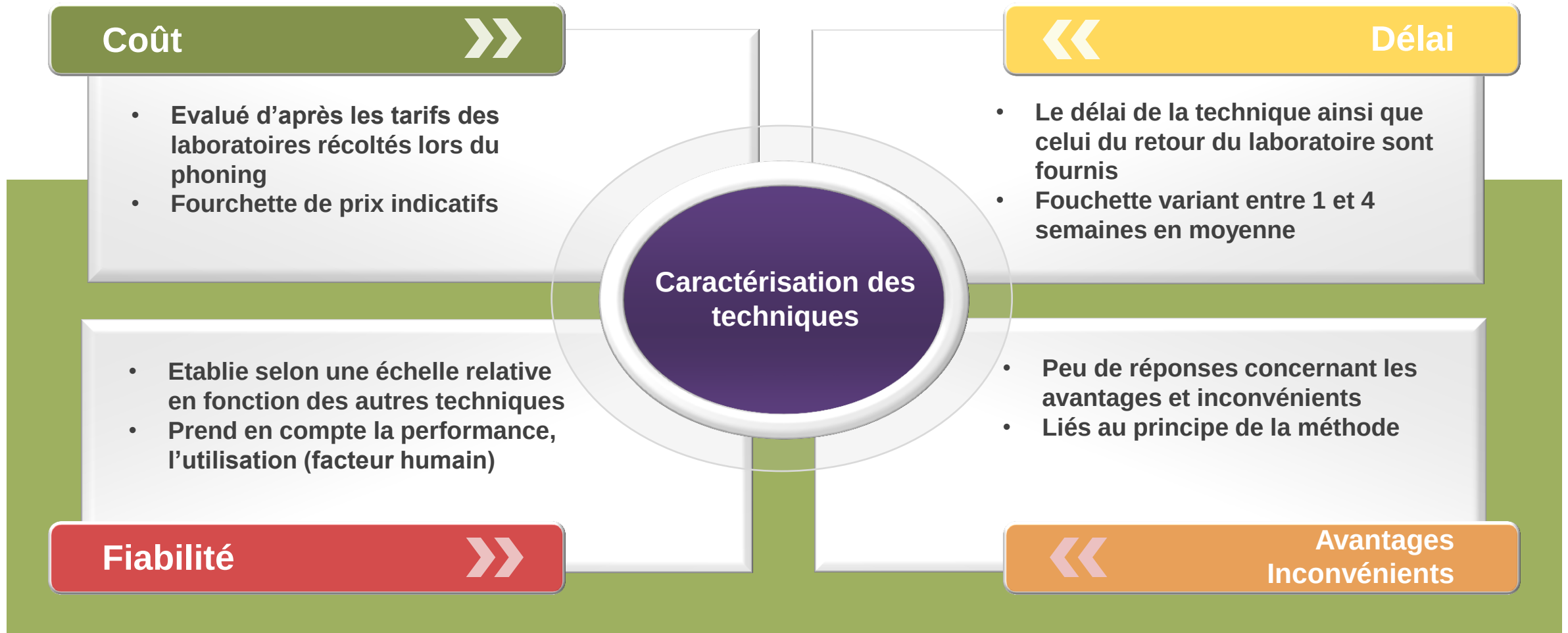
La révélation est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide. Elle peut également se faire par émission de fluorescence. L'ADN était révélée historiquement par une coloration au bromure d'éthidium. Aujourd'hui, l'agent intercalant le plus utilisé est le SYBR®Green. Cette étape de la PCR repose sur la migration des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. La séparation est réalisée lors du passage de l'amplicon (produits de l'amplification) dans un gel d'agarose ou d'acrylamide. Les acides nucléiques migrent à travers le gel avec des vitesses différentes selon le poids de la molécule.

Révélation en temps réel

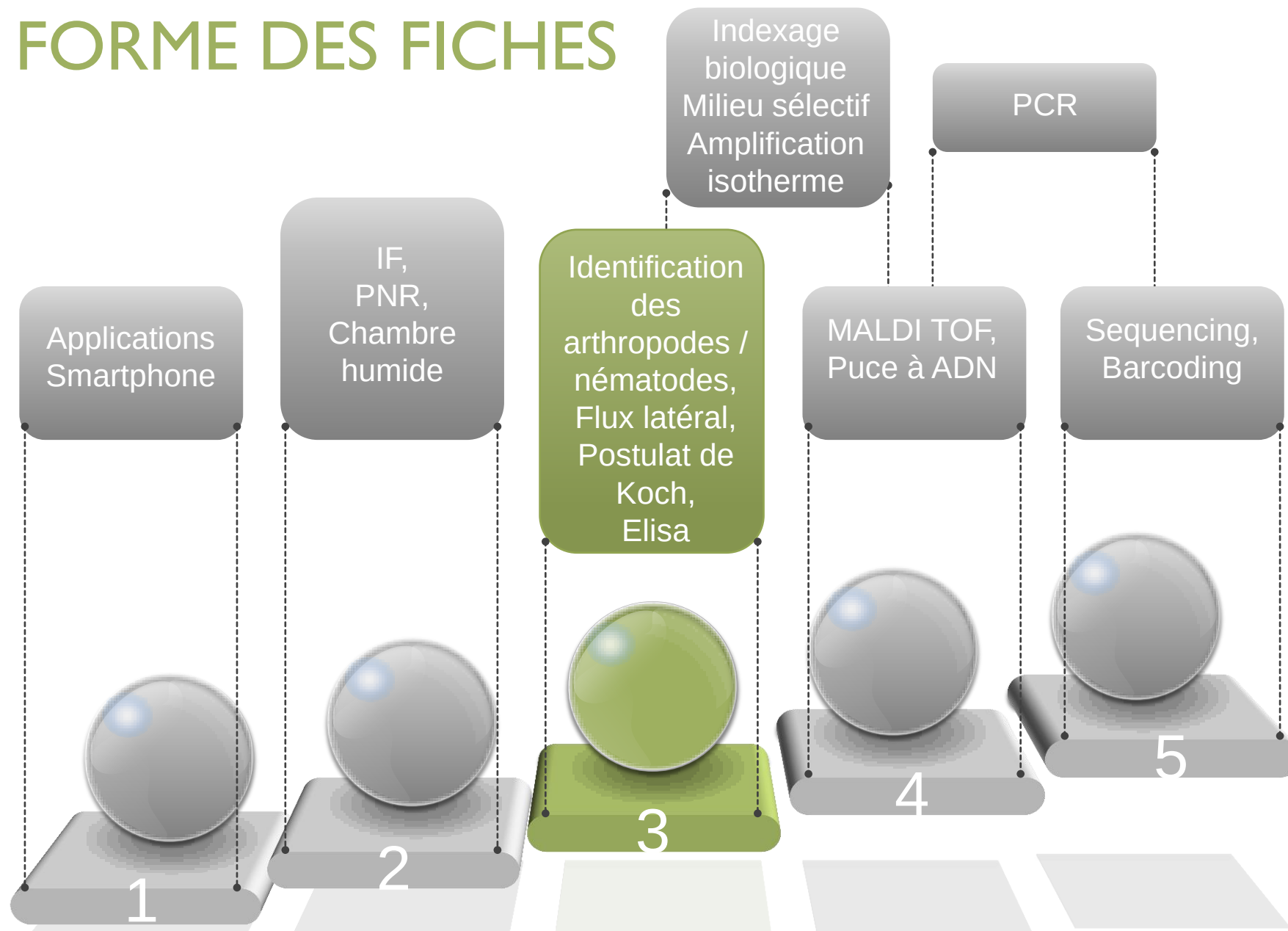
La révélation d'une PCR en temps réel est réalisée grâce à une courbe de fluorescence. La valeur de la fluorescence est corrélée à la quantité de produit amplifié. La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification par un signal fluorescent. Il en existe 2 groupes : les agents intercalants (bromure d'éthidium et SYBR®Green) et les sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacons, Scorpion).



MISE EN FORME DES FICHES



MISE EN FORME DES FICHES

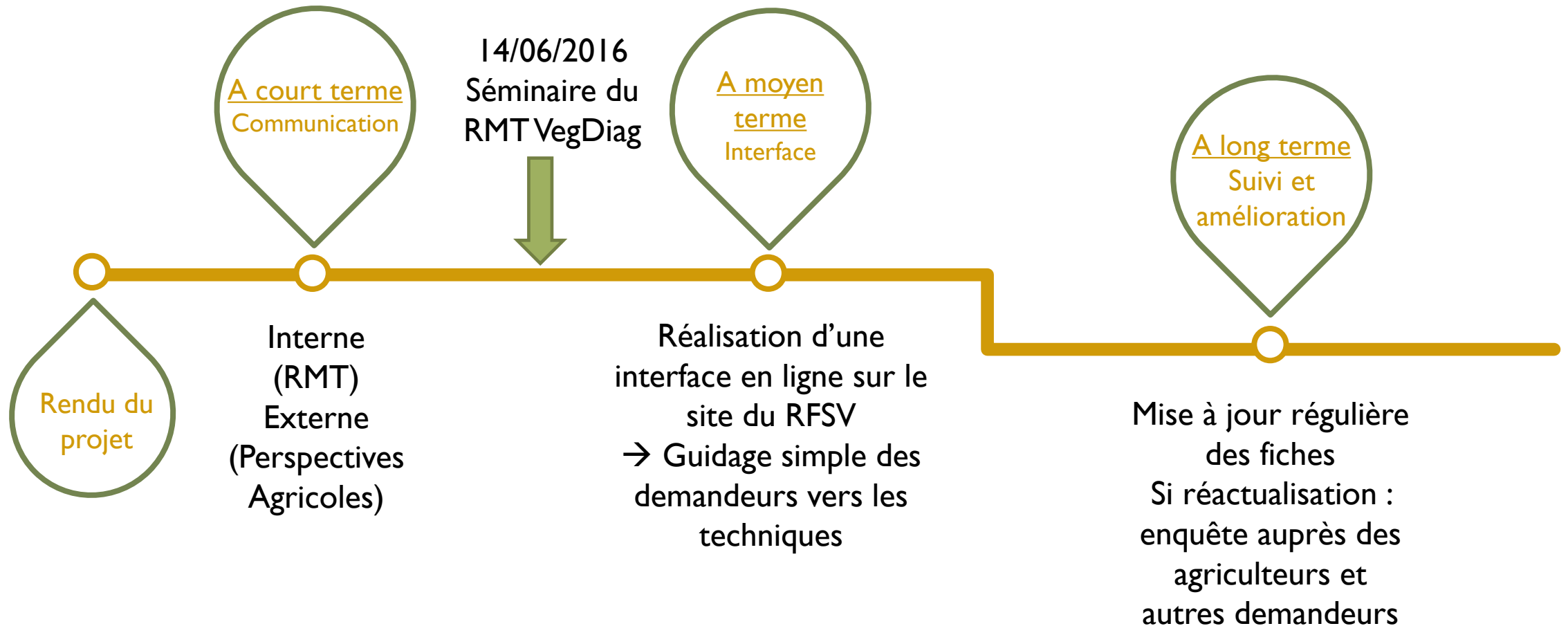


Evaluation d'une échelle de fiabilité

ORGANISATION DE LA PRÉSENTATION



PERSPECTIVES



REMERCIEMENTS

- M. ROLLAND
- M. BENIZRI
- Toutes les personnes ayant participées à la relecture et à l'amélioration des fiches



MERCI DE VOTRE ATTENTION

