

LES PRINCIPALES MÉTHODES DE DÉTECTION DES BIOAGRESSEURS DE QUARANTAINE

RENAUD IOOS

CONTEXTE PHYTOSANITAIRE

Le nombre de bioagresseurs en milieu forestier est particulièrement important. Dans cet écosystème composé principalement de plantes pérennes, il est primordial d'empêcher l'introduction de nouveaux bioagresseurs, car il est quasiment impossible d'envisager des traitements phytosanitaires. La lutte repose donc principalement sur la prévention et l'éradication en phase très précoce, dès la découverte de foyer(s).

La directive européenne 2000/29/CE inclut une liste des organismes de quarantaine interdits (sur la base d'Analyses du risque phytosanitaire), une autre relative aux végétaux et produits végétaux dits « à risque et interdits », ainsi que les mesures de protection contre leur introduction et leur propagation dans la Communauté. Cette directive est complétée par les listes A1 et A2 d'organismes recommandés pour réglementation de quarantaine régulièrement mises à jour par l'Organisation européenne pour la protection des plantes (OEPP). Le respect de cette directive visant à prévenir l'introduction et l'installation de bioagresseurs présentant un risque élevé pour les végétaux — en particulier les essences forestières — nécessite la mise en place de dispositifs de contrôles stricts. Il existe des contrôles à l'import, à l'export, ainsi qu'un contrôle sanitaire intérieur réalisé par les services officiels phytosanitaires. En France, ces contrôles s'appuient sur des analyses officielles de laboratoires.

En matière d'analyse, on peut distinguer deux approches : la détection spécifique et la recherche non ciblée. La détection spécifique repose sur la recherche *a priori* d'un bioagresseur, elle utilise un protocole permettant de donner un résultat de type "présence ou absence". Ce protocole doit donc être sensible et spécifique de l'organisme recherché. En revanche, la recherche non ciblée consiste à dresser une sorte d'inventaire de la diversité des bioagresseurs présents dans un échantillon. Cette approche va donc nécessiter l'utilisation de méthodes non ciblées, donc moins spécifiques et qui nécessiteront un temps d'analyse généralement plus long.

LES MÉTHODES DE DÉTECTION SPÉCIFIQUES D'UN BIOAGRESSEUR

L'amplification spécifique d'ADN, sous ses différents formats, est aujourd'hui la technique classiquement utilisée dans le cadre d'analyses de détection ciblée d'un bioagresseur. Son principe repose sur la recherche de traces d'ADN spécifiques du bioagresseur au sein du mélange complexe que représente un échantillon de plante ou de sol. L'ADN total de l'échantillon est tout

d'abord extrait. Si le bioagresseur ciblé y est présent, une courte région spécifique de son génome est ensuite recopiée des millions de fois, puis marquée par une molécule fluorescente. La réaction se produit dans un microtube de quelques microlitres et permet en moins de deux heures d'obtenir un résultat positif ou négatif.

La fiabilité de ces tests repose en grande partie sur la reconnaissance d'une ou plusieurs régions spécifiques du génome du bioagresseur. Ces dernières sont déterminées grâce à des études préalables de diversité génétique, qui permettent d'identifier des régions du génome présentant un caractère « exclusif » du bioagresseur recherché. Ces régions peuvent correspondre à des marqueurs phylogénétiques (évoluant différemment selon les espèces), des gènes associés à la pathogénicité ou encore des régions de fonction inconnue mais dont la séquence diverge suffisamment chez le bioagresseur recherché.

Une fois la région cible identifiée, les tests vont reposer sur différentes techniques pour l'amplifier et la rendre détectable par l'œil humain ou l'appareil de mesure. Les techniques d'amplification les plus fréquentes sont la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (en point final ou en temps réel) et l'amplification isotherme LAMP (*Loop Mediated isothermal Amplification*). Il existe de plus aujourd'hui des techniques de marquage chimique empêchant théoriquement toute amplification d'ADN à partir de cellules mortes, ce qui devrait permettre de ne détecter par PCR ou LAMP que des traces du génome de cellules viables et donc encore potentiellement infectieuses. Néanmoins, ces techniques doivent encore être fiabilisées avant d'envisager leur utilisation en routine.

La rapidité d'exécution est un autre avantage de ces tests moléculaires spécifiques. Ils sont par ailleurs facilement transférables d'un laboratoire à un autre, sans compétence particulière en taxonomie. Ils sont à ce titre souvent proposés comme méthodes de référence dans les protocoles internationaux de l'OEPP ou de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV). De plus, à partir d'un même échantillon, donc d'un même extrait d'ADN, il est possible de rechercher autant de bioagresseurs que l'on souhaite. Sous certaines conditions, la recherche de plusieurs bioagresseurs peut même se réaliser simultanément dans un seul tube — on parlera alors de multiplexage —, ce qui constitue un gain de temps et d'argent appréciable.

Pour pouvoir utiliser ce type de protocole avec confiance, notamment lors de la recherche d'organismes aussi importants que ceux de quarantaine, il est nécessaire d'avoir vérifié en amont sa fiabilité. En effet, contrairement aux techniques microbiologiques classiques, la détection du bioagresseur se fait de manière indirecte, sous forme d'un signal de fluorescence mesuré par un appareil. Des travaux de validation sont donc réalisés dans la phase de développement du protocole, pendant laquelle des manipulations vont permettre de vérifier que le protocole est spécifique, sensible, qu'il est répétable et reproductible (produit des résultats identiques avec des opérateurs différents et des équipements différents). Il est également recommandé d'évaluer la robustesse du test, en vérifiant qu'il reste sensible et spécifique, malgré de faibles variations des paramètres d'analyse (en mimant des dérives de température analytiques ou de minimes erreurs de pipetages).

LES MÉTHODES D'IDENTIFICATION NON CIBLÉES

L'autre type d'approche analytique utilisant le principe d'identification non ciblée a été longtemps la seule approche disponible. Elle a longtemps reposé sur des techniques d'identifications morphologiques, généralement au microscope ou à la loupe binoculaire, par comparaison avec des descriptions publiées dans la littérature spécialisée. Cette approche est toujours d'actualité pour des bioagresseurs de types fongiques, pour les ravageurs (insectes, acariens) ou pour les nématodes parasites. Pour les champignons, il est possible d'observer directement sur la plante les structures fongiques permettant leur identification (exemple : urédospores de rouilles), mais il faut

généralement passer par une étape préalable d'isolement mycologique pendant laquelle les microorganismes présents vont être séparés des tissus de la plante et mis en culture pure sur un milieu synthétique en boîte de Petri. Une fois obtenus en culture pure, ils vont être identifiés d'après des critères morphologiques dits discriminants, c'est-à-dire variables en fonction des genres et des espèces (aspect de la colonie, type de fructification, agencement, taille, couleur, ornementation des spores, etc.). Il en va de même pour les bactéries mais leur identification morphologique est souvent très complexe et nécessite l'utilisation d'autres techniques. Au final, quel que soit le bioagresseur, ce type d'approche morphologique nécessite une longue expérience et l'intervention de spécialistes de la discipline.

De nos jours, des techniques alternatives d'identification non ciblées proposent une approche puissante basée cette fois sur l'étude du génome ou du protéome.

La technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight*) permet de générer et d'analyser un spectre de masse correspondant aux fragments de protéines et polypeptides présents chez un champignon ou une colonie bactérienne en culture pure. En comparant ce spectre à ceux préenregistrés dans une base de spectres de référence, il est possible, en quelques minutes, d'identifier avec un certain degré de certitude l'espèce d'un champignon ou d'une bactérie, voire des niveaux inférieurs taxonomiques (figure 1, ci-dessous). Les protocoles d'identification restent encore toutefois loin d'être standardisés et une adaptation reste souvent nécessaire pour certains microorganismes comme les champignons. Bien que prometteuse, cette technologie n'a toutefois pas encore atteint le niveau de fiabilité nécessaire à son utilisation en routine dans le cadre de l'identification d'organismes de quarantaine.

La technique de l'analyse de code-barre génétique ou *barcoding* permet d'identifier un micro- ou un macro-organisme encore inconnu et potentiellement agressif. Elle consiste à extraire son ADN,

FIGURE 1 PRINCIPE GÉNÉRAL DE L'IDENTIFICATION D'UN ORGANISME PAR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF

La technique est classiquement utilisée pour l'identification de bactéries ou de champignons ; elle peut s'envisager pour des insectes lors des phases précoces de développement (œufs).

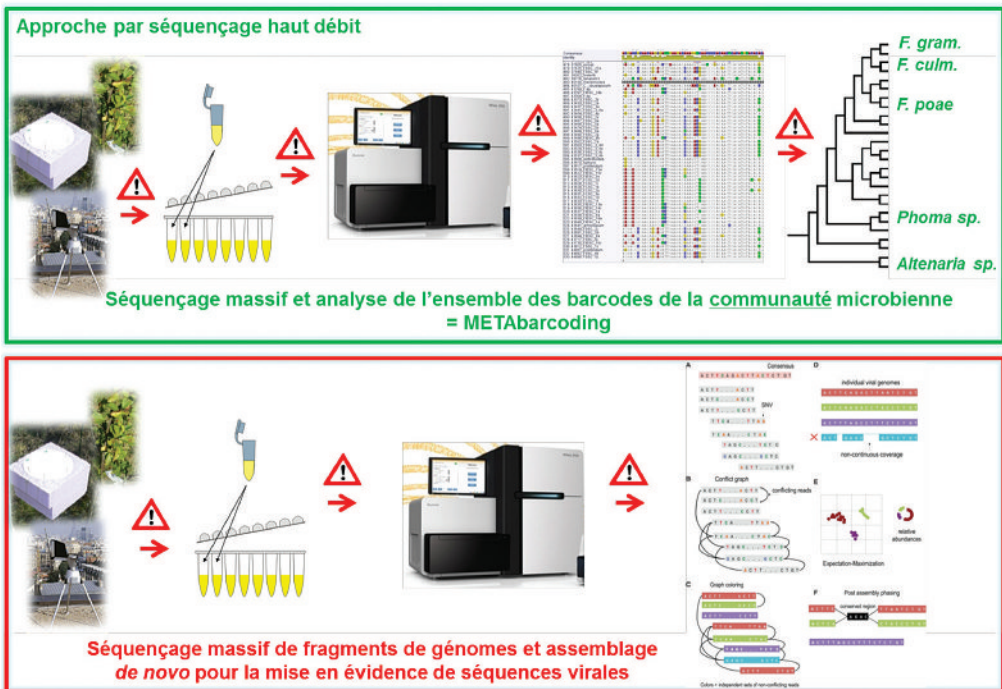


à amplifier par PCR une région particulière de son génome (le « code-barre ») et à comparer cette séquence d'ADN à une base de données de codes-barres de référence (c'est-à-dire déjà identifiées). Si de nombreuses bases de données sont en accès libre, certaines incluent néanmoins des données insuffisamment fiables. Pour confirmer l'identification, il s'avère de ce fait nécessaire de soumettre les résultats issus de la comparaison de séquences à un pathologiste : le pourcentage d'homologie obtenu permettra d'identifier le bioagresseur avec là aussi un certain degré de certitude. Pour certains genres de bioagresseurs, il apparaît en outre souvent nécessaire de multiplier les codes-barres pour maximiser la fiabilité et la précision des résultats. De plus, il est nécessaire d'obtenir préalablement une culture pure ou un spécimen isolé du bioagresseur avant de pouvoir analyser son code-barre génétique.

Depuis quelques années, de nouvelles technologies de séquençage ADN à haut débit sont apparues et leur potentiel en matière d'identification de masse est en cours d'étude. Ces techniques sont très prometteuses car elles permettent d'amplifier en masse une même région (code-barre) du génome à partir de l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon. On parlera alors d'approche par séquençage environnemental ou *metabarcoding*. Avec ces techniques, il n'apparaît plus nécessaire d'isoler au préalable chaque microorganisme et de l'analyser individuellement. L'ensemble des codes-barres est amplifié en une seule réaction. L'énorme quantité d'ADN générée doit ensuite être analysée par un traitement bio-informatique afin de nettoyer, de trier, de regrouper, de comparer les séquences amplifiées à des bases de données pour finalement produire un inventaire de la biodiversité présente au sein d'un échantillon (figure 2, ci-dessous).

FIGURE 2 APPORT DES NOUVELLES TECHNOLOGIES DE SÉQUENÇAGE ADN À HAUT DÉBIT POUR L'IDENTIFICATION EN MASSE DE MICROORGANISMES OU DE VIRUS DANS UN ÉCHANTILLON DE PLANTE OU DE SOL.

Les panneaux « danger » représentent les étapes clés du processus analytique, dont les paramètres peuvent influencer le résultat final.



Si ces techniques de séquençage à haut débit sont aujourd'hui très utilisées dans le domaine de la recherche et que leur usage se démocratise à mesure que leur coût baisse, elles ne sont pas encore utilisées pour le diagnostic de routine dans la mesure où de nombreuses étapes du processus analytique nécessitent encore des travaux d'optimisation. Dans le domaine de la virologie, elles ont néanmoins déjà beaucoup apporté, s'agissant d'un domaine où il s'avère particulièrement difficile « d'isoler » un virus pour l'étudier et l'identifier. Le séquençage de masse des génomes présents dans un échantillon végétal permet ainsi de mettre en évidence des séquences virales, qu'il s'agisse de virus connus et répertoriés dans des bases ou encore totalement inconnus (figure 2, p. 680). Le recours à ce type d'approche est aujourd'hui très sérieusement envisagé pour répondre aux besoins des professionnels dans le domaine de la certification du matériel végétal ou la recherche de virus de quarantaine.

Ces techniques non ciblées permettent principalement d'identifier un bioagresseur connu, en particulier un organisme de quarantaine, en le comparant à des références (mesures et images microscopiques, séquences codes-barres génétique, spectre de masse protéique). Avantage supplémentaire : elles permettent aussi de mettre en évidence un bioagresseur inconnu, c'est-à-dire qui ne figure pas dans les bases de données ou dont les caractéristiques morphologiques, génétiques ou protéiques ne correspondent à rien de décrit ou de répertorié. En ce sens, elles apportent un plus indéniable par rapport aux techniques ciblées de détection spécifique puisqu'elles peuvent « identifier l'inconnu » avec une approche qui est sans *a priori*. Des investigations supplémentaires devront cependant être menées pour déterminer le potentiel de dangerosité de ces « inconnus ».

PERSPECTIVES EN MATIÈRE D'IDENTIFICATION DE BIOAGRESSEURS

Les listes de bioagresseurs de quarantaine, comme celles des annexes de la directive européenne 2000/29/CE se réfèrent encore aujourd'hui principalement à leur identité taxonomique : genre, espèce, parfois un rang taxonomique inférieur. Certains rangs taxonomiques infraspécifiques sont basés sur le pouvoir pathogène, comme les *formae speciales* en mycologie ou les pathovars en bactériologie. Cette façon de procéder induit parfois des difficultés pratiques pour les laboratoires d'analyse, suite à des changements de noms, des regroupements ou inversement des séparations taxonomiques. En outre, l'identification taxonomique d'un bioagresseur de quarantaine ne garantit pas toujours la présence d'une souche ou d'un spécimen agressif. Plutôt que de classer les bioagresseurs en fonction de leur position taxonomique, certains scientifiques militent ainsi plutôt pour une approche ciblant leur pouvoir pathogène ou les caractéristiques (traits) biologiques associées à leur potentiel invasif. Les perspectives futures en matière d'identification pourraient ainsi consister à développer de nouveaux tests ciblant des gènes associés à la pathogénicité ou au potentiel invasif des bioagresseurs de quarantaine. Il est aussi envisagé d'adapter les protocoles de détection et d'identification à la recherche de cellules viables afin de minimiser le risque de détecter la présence d'un bioagresseur qui aurait été tué ou inactivé et ne présenterait en fait plus aucun risque. Néanmoins, la notion de tolérance zéro associée à la quarantaine phytosanitaire ne permet encore que rarement la prise en compte de ce paramètre.

Renaud IOOS
ANSES
Laboratoire de la Santé des Végétaux
Unité de mycologie
Domaine de Pixérécourt, Bât. E
CS 40009
F-54220 MALZÉVILLE
(renaud.ioos@anses.fr)

LES PRINCIPALES MÉTHODES DE DÉTECTION DES BIOAGRESSEURS DE QUARANTAINE (Résumé)

Dans le domaine forestier, la lutte contre les bioagresseurs de quarantaine commence par la prévention. Identifier rapidement et avec fiabilité un bioagresseur permet d'empêcher son entrée sur le territoire et d'envisager une éradication précoce en cas de découverte de foyer. Les méthodes d'identification utilisent principalement des techniques permettant de rechercher spécifiquement, *a priori*, un ou plusieurs bioagresseurs cibles dans un échantillon de plante ou de sol. L'essor des techniques d'amplification génique de type PCR (en point final ou en temps réel) a rendu ces détections très fiables et rapides. Une autre approche consiste à travailler sans *a priori*, en réalisant un inventaire microbiologique de l'échantillon à analyser. Elle a longtemps reposé sur des protocoles classiques de caractérisation morphologique, mais l'apport des nouvelles techniques de séquençage d'ADN [code-barres d'ADN (*barcoding*), séquençage environnemental (*metabarcode*)] ou d'analyse du protéome (spectrométrie de masse MALDI-TOF) permet à présent d'identifier les bioagresseurs sans les rechercher *a priori*. Les perspectives en matière de méthode de détection sont nombreuses et s'orienteront peut-être vers des techniques ciblant plus spécifiquement les microorganismes sur la base de leur potentiel de pathogénicité.

THE MAIN METHODS FOR DETECTING QUARANTINE PESTS (Abstract)

In the forestry area, quarantine pest control begins with prevention. Rapid, reliable identification of a pest helps to prevent it from entering the territory and to contemplate early eradication when an outbreak is discovered. Identification methods mainly call on techniques for previously specified target pests in a plant or soil sample. The development of PCR type techniques (end point or real time) has made these detections very fast and reliable. Another approach works without a pre-specified target by conducting a microbiological inventory of the test sample. For a long time this has relied on conventional protocols for morphological characterisation but new DNA sequencing techniques (DNA barcoding, meta-barcoding) or proteomic analysis (MALDI-TOF mass spectrometry) now allow identification of pests that are not pre-specified. This opens broad perspectives for detection methods which may evolve towards techniques that more specifically target microorganisms on the basis of their potential pathogenicity.
