

Techniques moléculaires de détection et d'identification des agents phytopathogènes

Philippe Lepoivre, Jean Kummert, Dominique Colinet, Olivier Duterme, Christine Anceau

L'objectif principal du phytopathologiste est d'œuvrer dans la perspective d'une lutte préventive ou curative contre les maladies des plantes. Dès lors, la capacité à identifier correctement et à mettre en évidence, de façon sûre et précoce, un agent pathogène dans une plante infectée représente une étape essentielle de sa mission.

À cet égard, l'évolution contemporaine des systèmes de production agricoles et horticoles accroît la nécessité de pouvoir disposer de techniques de diagnostic simples, rapides, sensibles, fiables, applicables à un grand nombre d'échantillons et d'un coût acceptable pour les utilisateurs.

Dans le passé, l'introduction de nouveaux agents pathogènes dans des zones géographiques dont ils étaient jusqu'alors absents a grandement contribué à l'extension des maladies des plantes cultivées. L'accroissement considérable du volume des échanges commerciaux intra et intercontinentaux ainsi que l'augmentation des vitesses de déplacement constituent des facteurs contemporains d'aggravation de ce risque [1]. Par ailleurs, la constitution de zones de libre-échange économique, au sein desquelles les barrières douanières sont supprimées, renforce la nécessité d'un contrôle rigoureux de l'état sanitaire du matériel végé-

tal au départ de la production. Par exemple, très récemment encore, chaque État membre de l'union européenne constituait un espace phytosanitaire fermé ; un produit végétal remplissant les conditions nécessaires à sa commercialisation sur un marché national pouvait dès lors ne pas satisfaire aux exigences phytosanitaires définies dans le cadre des échanges internationaux au sein de l'Union. La nouvelle réglementation qui se met en place prévoit la suppression des doubles contrôles phytosanitaires, au départ et à l'arrivée du matériel, au profit d'un contrôle unique à la production qui serait associé à la délivrance d'un passeport végétal obligatoire, attestant que le matériel a été produit selon des normes phytosanitaires définies [2].

Les différentes techniques de détection et d'identification des agents phytopathogènes basées sur l'hybridation des acides nucléiques, qui permettent d'atteindre cet objectif, seront analysées ici.

Le diagnostic des maladies parasitaires des végétaux

Le problème du diagnostic des maladies des plantes inclut deux composantes qui diffèrent par les exigences techniques et d'organisation qu'elles impliquent :

— la détection d'un agent pathogène, dans le cadre d'une procédure de certifi-

cation ou de quarantaine, exige que la sensibilité de la technique adoptée permette la mise en évidence des infections latentes chez les plantes ne présentant pas de symptômes ;

— l'identification de l'agent causal requiert la mise en œuvre de techniques moins sensibles que pour la détection mais présentant des niveaux de spécificité tels qu'ils permettent de caractériser cet agent avec la précision adaptée au problème considéré (espèce, pathovar, biotype...).

Les progrès de la biologie moléculaire (et de la génétique) ont favorisé l'émergence de nombreuses techniques utilisant la caractérisation de molécules immunogènes (en particulier les protéines) ou de séquences d'acides nucléiques [3]. Ces méthodes connaissent déjà, ou pourraient connaître très prochainement, des développements croissants conduisant à une commercialisation des tests de diagnostic des agents pathogènes des plantes. Il importe dès lors que les utilisateurs de ces différentes techniques (pathologistes, améliorateurs, producteurs de semences et plants, législateurs) soient correctement informés des avancées techniques qui s'y rapportent, de leurs potentialités et de leurs limites.

Méthodes immunologiques

Les immuno-essais reposent sur la réaction entre un antigène (Ag) et un anticorps (Ac). Les anticorps sont des protéines de haut poids moléculaire,

P. Lepoivre, J. Kummert, D. Colinet, O. Duterme, C. Anceau : Unité de phytopathologie, Faculté des Sciences agronomiques, B-5030 Gembloux, Belgique.

Tirés à part : P. Lepoivre

Glossaire

ARN monocaténaire : acide ribonucléique simple brin.

ARN bicaténaire : acide ribonucléique constitué de deux brins complémentaires.

Antigénique : qualifie une molécule induisant une réaction immunitaire.

Épitope : déterminant antigénique.

Plasmide : ADN extra-chromosomique capable d'être répliqué dans la cellule hôte et utilisé comme vecteur de clonage.

Polyprotéine : produit de la traduction des ARN génomiques des potyvirus, réunissant l'ensemble des protéines virales et qui subit ultérieurement une maturation par clivage endopeptidique donnant naissance aux protéines fonctionnelles.

Polynucléotide : chaîne formée par l'union de plusieurs nucléotides.

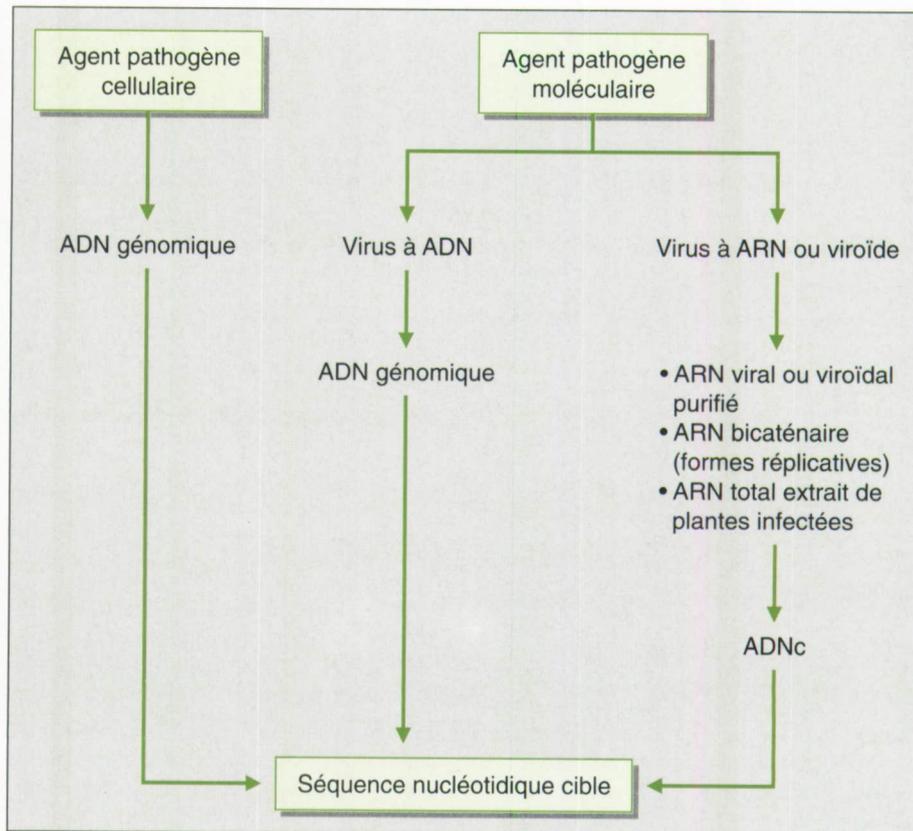


Figure 1. Origines des séquences de nucléotides sélectionnées.

Figure 1. Origin of selected target nucleotidic sequences.

obtenus par immunisation d'animaux à sang chaud (souris, lapin, chèvre) par des molécules immunogènes (protéines, polysaccharides, ARN bicaténaires...). Ils sont dits, dans ce cas, polyclonaux, car provenant de l'activation d'une population hétérogène de cellules de lymphocytes B dans le sang de l'animal. Ils constituent de ce fait un mélange d'anticorps différents, réagissant à l'égard de nombreux déterminants antigéniques ou épitopes de la molécule immunogène.

La spécificité des réactions anticorps/antigène fait de l'immunologie un outil très performant pour le diagnostic des maladies induites par les virus, mycoplasmes, bactéries, molluscites et champignons [3, 4].

Un article traitant du problème du diagnostic des champignons phytopathogènes à l'aide des techniques sérologiques et de la connaissance des protéines spécifiques sera présenté dans un prochain numéro des *Cahiers Agricultures*.

Le marquage enzymatique des anticorps, destiné à révéler la formation du complexe anticorps/antigène, a conduit à un ensemble de tests immuno-enzymatiques

(tests Elisa, *immunoblotting*...) qui sont utilisés depuis longtemps pour diagnostiquer les agents phytopathogènes (virus, bactéries et, plus récemment, champignons).

L'obtention d'anticorps peut rencontrer des difficultés qui compromettent l'utilisation des techniques immunologiques. C'est le cas pour des maladies à étiologie mal définie, ou pour des affections dont l'agent ne peut être cultivé *in vitro* (molécules infectieuses, parasites obligatoires). L'approche sérologique s'avère également difficile dans le cadre d'une procédure de certification, lorsque l'agent pathogène présente une grande variabilité et que les tests sérologiques sont spécifiques d'une (ou de quelques) souche(s) particulière(s).

Enfin, l'approche sérologique exige qu'un antigène spécifique à l'agent pathogène ciblé soit exprimé au niveau de la plante infectée. Par exemple, les formes L (procaryotes dépourvus de paroi) échappent à la détection par des anticorps dressés contre des molécules constitutives des parois bactériennes. De

même, les protéines enveloppes de virus ne sont pas suffisamment exprimées chez les plantes virosées après la thermothérapie. Cette limite n'existe pas avec les techniques visant à détecter les séquences de nucléotides.

Méthodes basées sur l'hybridation des acides nucléiques

Le principe de l'hybridation moléculaire repose sur la capacité de deux chaînes d'acides nucléiques complémentaires, placées dans des solutions adéquates de salinité et de pH appropriés, à se dissocier lorsqu'elles sont portées à une température proche de 100 °C, et à se réassocier par refroidissement lent.

Dès lors, des séquences marquées d'ADN ou d'ARN monocaténaire (séquences sondes) sont capables, sous certaines conditions, de s'hybrider à leurs séquences complémentaires (séquences cibles présentes au sein d'un mélange

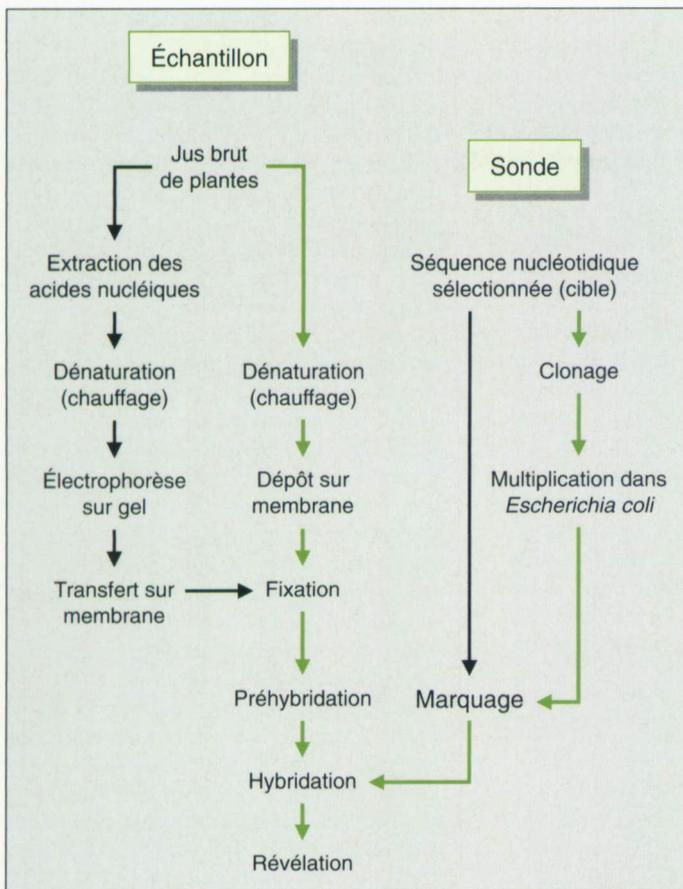
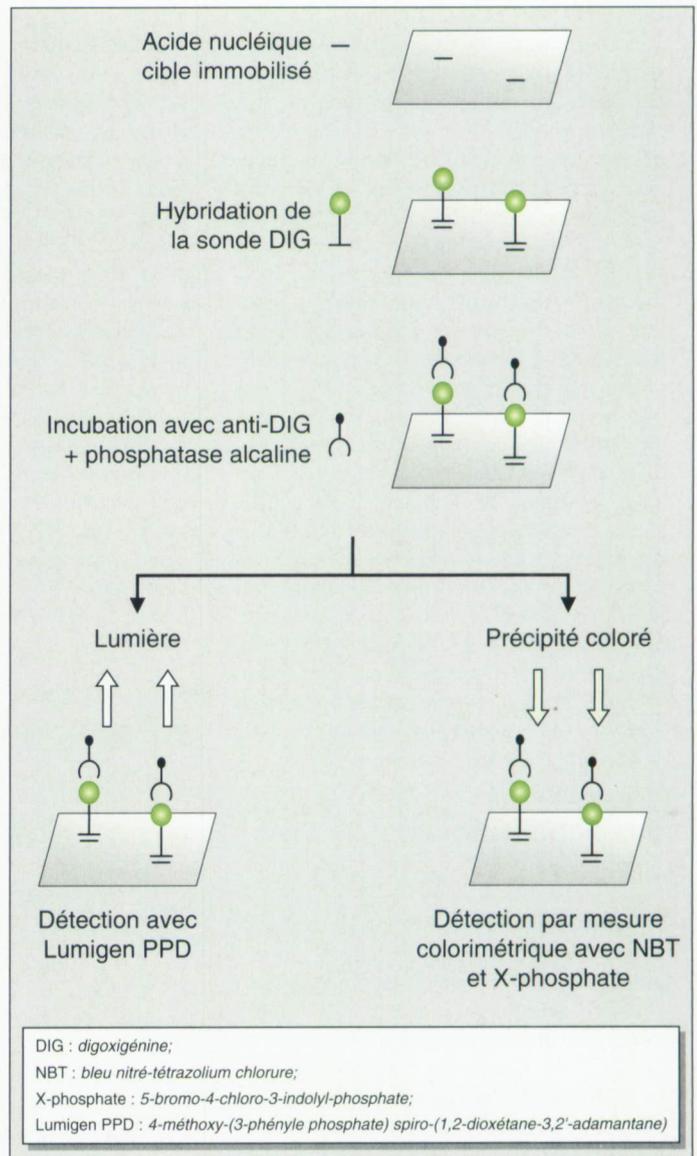


Figure 2. Schéma général des tests d'hybridation moléculaire sur membrane.

Figure 2. Flow chart of molecular hybridization tests on membrane.

Figure 3. Test d'hybridation avec marqueur non radioactif, utilisant la chémoluminescence ou la colorimétrie.

Figure 3. Non-radioactive hybridization assay using chemoluminescence or colorimetry.



DIG : digoxigénine;
 NBT : bleu nitro-tétrazolium chlorure;
 X-phosphate : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate;
 Lumigen PPD : 4-méthoxy-(3-phényl phosphat) spiro-(1,2-dioxétane-3,2'-adamantane)

complexe de polynucléotides) en formant des duplex stables marqués, permettant de la sorte l'identification de séquences nucléotidiques spécifiques. Dès à présent, la technique d'hybridation moléculaire sur membrane (*dot blot*) est utilisable pour la détection des différents types d'agents pathogènes des plantes [3].

La mise au point et l'utilisation de tests d'hybridation moléculaire comportent plusieurs étapes.

Préparation de la sonde

Dans le cas des agents phytopathogènes de type cellulaire ou des virus à génome d'ADN, la séquence de l'acide nucléique ciblé qui sera utilisée pour fabriquer la sonde (très généralement de l'ADN) peut être directement purifiée à partir de l'agent extrait de la plante infectée ou

cultivé *in vitro*. Pour les virus à génome d'ARN, la séquence cible devra être préparée à partir de virus purifiés (ou à partir d'ARN bicaténaire ou d'ARN totaux directement extraits des plantes virosées) et convertie en ADN par synthèse réverse d'ADN complémentaire (ADNc) (figure 1).

Les fragments d'ADN sélectionnés seront clonés par insertion dans un plasmide qui sera multiplié dans la bactérie *Escherichia coli* en fournissant de grandes quantités de sonde déterminée. Cette technologie a permis de développer l'hybridation moléculaire comme méthode pratique de diagnostic (figure 2).

Marquage de la sonde

La détection d'une sonde, fixée à des

séquences de l'acide nucléique cible de l'agent pathogène que l'on recherche, est réalisable grâce à la liaison d'un marqueur sur l'ADN ou l'ARN de la sonde. Dans le cas de sondes radioactives, cette reconnaissance se fait grâce à l'incorporation d'un nucléotide marqué au ³²P lors de la synthèse de la sonde. Après hybridation de cette dernière avec l'acide nucléique de l'agent pathogène, ces nucléotides marqués seront révélés par autoradiographie. Bien que l'utilisation de la radioactivité confère aux tests d'hybridation une très grande sensibilité, la durée de vie des sondes radioactives est courte (demi-vie de quatorze jours pour le ³²P) et leur utilisation exige une infrastructure complexe.

Plus récemment, des sondes dites froides (car ne comportant pas d'éléments radio-

actifs) ont été mises au point [5]. Bien que leur emploi entraîne une moindre sensibilité des tests d'hybridation moléculaire, leur intérêt réside dans le fait que leur synthèse et leur utilisation ne nécessitent pas d'infrastructures spéciales pour la manipulation et le stockage des produits radioactifs. Leur détection fait appel à des systèmes enzymatiques simples (peroxydase ou phosphatase alcaline), qui transforment un substrat incolore et soluble en un produit coloré ou luminescent, permettant ainsi sa visualisation rapide. À partir de ce principe, de nombreuses techniques ont été élaborées, qui sont fondées soit sur la détection directe de l'hybride moléculaire par couplage covalent de l'enzyme à la sonde, soit sur la détection indirecte de l'hybride à l'aide de systèmes utilisant des molécules intermédiaires (biotine ou haptènes) capables de reconnaître des motifs fixés sur la sonde nucléique [6, 7]. Ces molécules intermédiaires sont elles-mêmes couplées, directement ou non, à l'enzyme de visualisation choisie.

Préparation des échantillons à tester

L'hybridation sur membrane de nitrocellulose ou de nylon, sur laquelle a été préalablement déposé et fixé l'échantillon à tester (*dot blot*), constitue une technique de diagnostic sensible, facile et rapide. Elle présente l'avantage de pouvoir être réalisée à partir d'extraits de plante relativement peu purifiés et permet de tester des échantillons multiples sur un même support (*figure 3*). Le protocole de préparation de l'échantillon doit être adapté à l'agent pathogène à détecter. À partir d'extraits bruts ou de broyats de plantes réalisés dans un milieu tamponné, l'acide nucléique peut être rendu accessible à la sonde par différents procédés : traitement à la chaleur, hydrolyse alcaline, traitement par une protéinase, ... Les techniques actuelles de marquage non radioactif des sondes, couplées à des systèmes de révélation faisant appel à la chimioluminescence, permettent de rencontrer à la fois les exigences de sensibilité et de spécificité, en éliminant les problèmes de coloration non spécifique provenant des extraits bruts de plante déposés sur la membrane support de l'hybridation.

Outre le *dot blot* classique, une autre manière d'envisager la transposition pra-

tique des tests de diagnostic par hybridation moléculaire consiste à réaliser une hybridation en sandwich en milieu liquide. On utilise à cet effet deux sondes marquées différemment et correspondant à des séquences nucléotidiques voisines, mais non chevauchantes, de l'organisme cible [8]. La première sonde peut être marquée à la biotine, la réaction étant alors réalisée dans les plaques de microtitration sensibilisée à la streptavidine (formation d'un complexe biotine-streptavidine). Le marquage de la deuxième sonde peut utiliser le système digoxigénine-anticorps antidigoxigénine (couplé à la phosphatase alcaline), ou encore le marquage direct à la peroxydase. Le test sera entièrement réalisé dans des plaques de titration à 96 puits. La présence d'un agent pathogène pourra être détectée à l'aide d'un photomètre, comme dans le cas de la lecture des plaques de microtitration lors des tests sérologiques Elisa.

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La sensibilité des tests d'hybridation par *dot blot* se trouve limitée par le nombre de molécules « cibles » présentes dans l'échantillon à caractériser. Le recours à l'amplification moléculaire *via* la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *encadré 1, figure 4*) [9] a permis de reculer les limites de sensibilité des techniques de diagnostic basées sur la détection de séquences spécifiques d'acides nucléiques. La PCR a également grandement facilité les opérations d'obtention et de clonage des sondes, lorsque les séquences nucléotidiques de l'agent pathogène en cause sont connues mais que l'obtention de préparations purifiées de cet agent est difficile (virus instable et/ou sensible aux ribonucléases, mycoplasme ou bactérie non cultivable *in vitro*). Dans le cas des mycoplasmes notamment, les techniques d'obtention d'ADN cloné spécifique à partir des acides nucléiques totaux extraits de préparations de plantes infectées sont très complexes. L'analyse des séquences des ARNs ribosomiques 16S des mycoplasmes a permis de définir différents couples d'amorces soit polyvalentes, soit, au contraire, spécifiques d'un mycoplasme déterminé [10]. Des sondes peuvent être facilement développées après clonage

des produits d'amplification PCR dans des plasmides bactériens.

Un des problèmes liés à l'utilisation de la PCR réside dans la préparation des échantillons d'acides nucléiques purifiés, ce qui rend difficile son emploi courant dans le domaine du diagnostic. Ceci est particulièrement vrai pour les virus à génome d'ARN, pour lesquels la réaction PCR ne peut être réalisée qu'après rétrotranscription sous forme d'ADNc (RT-PCR) à partir des séquences virales contenues dans une préparation purifiée des ARN totaux de plantes infectées. Des adaptations permettent, dans certains cas, la réalisation des différentes étapes du processus (obtention de l'ARN viral à partir de jus brut, rétrotranscription et amplification de l'ADNc) directement dans un seul et même tube.

Une approche très prometteuse en terme de sensibilité repose sur l'utilisation combinée de l'immunocapture des particules virales sur plaque de microtitration par des anticorps appropriés, suivie de la PCR. Dans le cas de la détection du virus de la sharka du prunier, les chercheurs de l'Inra de Bordeaux [11] ont montré que l'immunocapture couplée à la PCR était 250, 625 ou 5 000 fois plus sensible que, respectivement, la PCR directe, l'hybridation avec une sonde d'ADNc marquée au ^{32}P ou la technique Elisa.

Si les produits d'amplification sont quantifiés par spectrofluorométrie appliquée directement sur la plaque de microtitration, l'immuno-PCR devient plus sensible et aussi rapide que la technique sérologique Elisa et peut également être facilement automatisée. Nolasco *et al.* [12] ont montré que la détection du virus de la Tristeza des agrumes à partir de jus bruts de rameaux d'orangers était réalisable, jusqu'à une dilution de 10^{-7} , par la technique immuno-PCR couplée à la spectrofluorométrie, et seulement jusqu'à une dilution de 10^{-3} par sérologie Elisa utilisant le même anticorps.

Critères d'évaluation des techniques de diagnostic

L'importance des enjeux économiques liés à la certification phytosanitaire stimule puissamment la recherche de nouvelles méthodes de diagnostic des agents phytopathogènes avec, comme objectif,

Encadré 1.

La méthode PCR

La méthode PCR s'appuie sur les principes suivants :

— deux oligonucléotides (ou amorces) s'hybrident respectivement aux extrémités 5' des deux brins d'un fragment d'ADN bicaténaire. Dans le cas du diagnostic des virus à génome d'ARN, la PCR doit être précédée d'une étape de rétrotranscription (RT) de ces ARNs (RT-PCR) (figure 4) ;

— l'ADN polymérase synthétise les brins complémentaires du fragment d'ADN modèle à partir des extrémités 3' des oligonucléotides servant d'amorce. Le facteur de multiplication est de deux à l'issue de ce premier cycle ;

— les produits issus de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur ;

— les amorces oligonucléotidiques sont à nouveau hybridées avec la préparation originale d'ADN cible ainsi qu'avec l'ADN produit lors du premier cycle d'amplification, chaque brin disponible servant ensuite de modèle à l'ADN polymérase.

L'emploi d'une ADN polymérase thermostable (Taq ADN polymérase) a permis de développer des cycleurs automatiques pour l'usage en routine de la PCR.

l'amélioration de la sensibilité, de la spécificité et de la facilité d'emploi des tests qui constituent les critères principaux permettant d'évaluer l'intérêt potentiel d'une technique.

Spécificité des techniques de diagnostic

La spécificité d'une technique de diagnostic doit être évaluée en fonction de sa finalité de mise en œuvre. Dans un laboratoire chargé de contrôler le respect des réglementations phytosanitaires de quarantaine ou de certification, la disponibilité de tests de diagnostic peu spécifiques (capables de détecter toutes les souches appartenant à un même agent pathogène, voire même de mettre en évidence plusieurs agents appartenant à un même groupe taxonomique) peut contribuer à réduire le nombre de tests à réaliser et, donc, le coût de la procédure [1, 13]. La polyvalence des techniques de diagnostic est particulièrement importante pour la certification de plantes infectées par des complexes parasitaires dont l'étiologie demeure mal précisée, comme c'est le cas pour les virus de la patate douce [14] ou de l'igname. Cette polyvalence peut être obtenue grâce à des tests sérologiques capables de reconnaître des épitopes communs à plusieurs agents pathogènes. Un anticorps monoclonal dressé contre des structures d'ARN bicaténaire, (correspondant à la forme répliquative des virus à ARN monocaténaire, qui est normalement absente dans des plantes saines), rencontre également ce critère de polyvalence [15].

En matière d'hybridation moléculaire, la recherche de séquences nucléotidiques hautement conservées chez différents virus permet également de rencontrer l'exigence de polyvalence, tout en maintenant une sensibilité élevée grâce à l'utilisation de la PCR. Ainsi, parmi les virus infectant la patate douce, plusieurs agents appartenant aux potyvirus ont été fréquemment décrits [16], justifiant le développement d'une technique de détection polyvalente des virus de ce groupe. Dans ce contexte, nous avons recherché des amorces polyvalentes permettant l'amplification de tous les potyvirus infectant la patate douce, avec différenciation subséquente par analyse de la taille des fragments amplifiés et/ou de leurs profils de restriction. Sur base de la séquence en acides aminés de la polyprotéine codée par plusieurs potyvirus, nous avons sélectionné plusieurs régions présentant un haut pourcentage d'homologie [17]. Des amorces synthétiques représentant tous les oligonucléotides pouvant coder pour ces séquences d'acides aminés ont été synthétisées.

L'analyse, par électrophorèse en gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, des produits d'amplification (obtenus à partir de transcrits ADNc des ARNs totaux de la plante soumise au test) pour l'un de ces couples d'amorces (figure 5) révèle l'infection soit par un seul virus, soit par un complexe viral [18]. Cette approche polyvalente ne requiert pas la purification préalable des composantes du complexe viral. Elle s'avère donc particulièrement utile quand les tests sont réalisés dans le

contexte de quarantaine ou de certification de l'état sanitaire de plantes dont l'étiologie des agents viraux est encore imprécise. Par ailleurs, le clonage dans un plasmide bactérien de fragments du génome d'un agent pathogène, amplifié par PCR à l'aide d'amorces polyvalentes, permet l'obtention de sondes moléculaires pour lesquelles les tests d'hybridation par *dot blot* s'avèrent très spécifiques vis-à-vis de l'agent dont les séquences ont été amplifiées. Ces tests sont déjà utilisables dans des travaux de taxonomie ou d'épidémiologie [18].

La relation entre la spécificité du test de diagnostic et le pouvoir pathogène d'un agent déterminé dépend de l'utilisation, comme molécules cibles, de facteurs de virulence spécifiques de la relation hôte-parasite chez le couple plante-pathogène considéré. Une cible inappropriée conduit en effet à un test sérologique manquant de spécificité ou, au contraire, présentant une spécificité trop poussée, ce qui le rendrait incapable de reconnaître l'ensemble des sérotypes d'un même agent pathogène. Considérant que les pectate lyases (PL) d'*Erwinia carotovora* sont des déterminants de la virulence de cette bactérie, des anticorps monoclonaux dressés contre les PL ou des sondes moléculaires correspondant à des fragments d'ADN complémentaire des gènes PL ont été recherchés pour les utiliser comme technique de diagnostic spécifique des souches bactériennes responsables de la pourriture molle.

Si la distinction des races physiologiques (biotypes) des agents pathogènes arrive progressivement à la portée des techniques d'analyse de génomes, il faut cependant garder à l'esprit que la performance technique n'est pas une fin en soi et que le degré de spécificité requis pour identifier l'agent d'une maladie doit être en relation, notamment, avec la méthode de lutte qui sera ensuite appliquée. La désinfection d'un sol par la chaleur peut être décidée après identification sommaire d'un agent pathogène parce que ce procédé de lutte est peu sélectif. Au contraire, un niveau très élevé de spécificité est requis quand il s'agit de gérer rationnellement des gènes de résistance dans une culture en s'appuyant sur l'inventaire des gènes de virulence de la population des agents pathogènes, ou quand il faut choisir, de la façon la plus adéquate possible, une molécule phytosanitaire en détectant précocement les souches d'un agent pathogène résistantes à un pesticide [19].

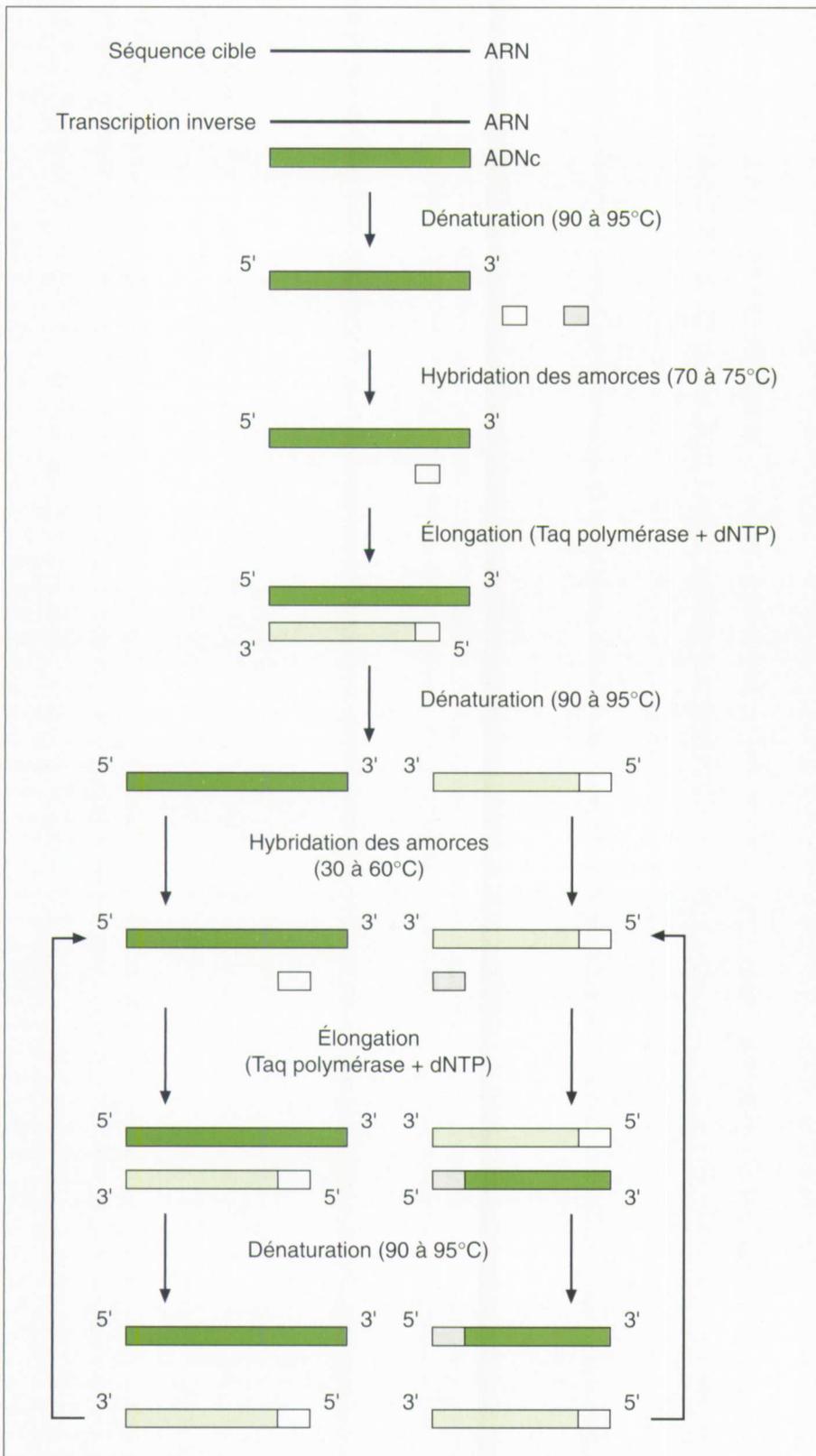


Figure 4. Schéma de la technique RT-PCR (RT = transcriptase inverse, PCR = réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN).

Figure 4. Flow chart of RT-PCR technique (RT = reverse transcriptase, PCR = DNA polymerase chain reaction).

Sensibilité des tests de diagnostic

Les niveaux de sensibilité des techniques de diagnostic doivent être compatibles avec l'utilisation d'échantillons de petite taille et permettre la détection d'infections latentes, ainsi que celles d'agents irrégulièrement répartis dans l'hôte ou dont la concentration varie au cours de la saison de culture.

Les seuils de sensibilité pour la détection des bactéries par les principales techniques sérologiques (Elisa et immunofluorescence) varient de 10 000 à 1 000 000 cellules bactériennes/ml. Ces tests peuvent dès lors identifier sans ambiguïté les infections déclarées, mais non les infections latentes (100 cellules bactériennes/lenticelle dans le cas d'*Erwinia carotovora*, l'agent de la pourriture molle des tubercules de pomme de terre), alors que ces dernières présentent le plus de danger dans le cadre d'une procédure de certification [20]. Les méthodes moléculaires (hybridation moléculaire, PCR) constituent donc, grâce à leur grande sensibilité, un progrès significatif à cet égard et se prêtent bien à la détection des infections latentes chez les plantes herbacées comme, par exemple, la mise en évidence de *Phytophthora fragariae* dans les plants de fraisiers ou d'*Erwinia chrysanthemi* dans les tubercules de pommes de terre [21].

Dans le cas des virus, les niveaux de sensibilité des tests sérologiques Elisa et d'hybridation moléculaire à l'aide de sondes à marquage non radioactif sont semblables. S'adressant à la totalité du génome du parasite, les techniques d'hybridation moléculaire permettent cependant de sélectionner plus facilement des motifs utilisables pour élaborer tantôt des tests polyvalents, tantôt, au contraire, des tests très spécifiques.

Toutefois, l'emploi des techniques de détection très sensibles doit être adapté au but poursuivi et la signification biologique de très bas niveau d'inoculum détecté doit être évaluée. Il apparaît tout d'abord qu'aucun test de détection ne peut prouver l'absence totale de contamination, avec comme corollaire que la « tolérance zéro » en terme d'importation ne peut être assurée que par l'embargo total.

Un deuxième élément d'appréciation consiste à évaluer les seuils de détection requis, en tenant compte de la quantité d'inoculum qui assure, avec une probabilité raisonnable, le développement ulté-

Summary

Molecular techniques for the detection and identification of plant pathogens

P. Lepoivre, J. Kummert, D. Colinet, O. Duterme, C. Anceau

Current developments in agricultural and horticultural production systems require simple, rapid and sensitive techniques for the diagnosis of plant pathogens.

Progress in molecular biology and medical diagnosis generated a number of biochemical techniques that have been successfully applied to crop protection and plant pathogen detection.

Among serological methods, enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) is the most commonly used technique nowadays for viral and bacterial detection and identification. It meets the desired requirements for generalized use and can be easily automated.

Recently, molecular hybridization techniques for testing plant pathogens have gained worldwide acceptance. They involve the use of labelled complementary DNA or RNA (cDNA, cRNA) prepared from the nucleic acid of the pathogen as a probe (fig. 1). Nucleic acid hybridization is generally done by blotting test samples onto a nylon or nitrocellulose membrane, and then incubating the membrane with the probe (fig. 2 and 3).

One drawback in the use of probes, as commonly applied, was linked to radioactive labelling, which causes problems for developing "user friendly" kits. While radioactive probes are reliable and safe in well-equipped laboratories, they are not suitable for widespread use. Non-radioactive labelling, either direct (peroxydase) or indirect (biotin-streptavidin, and digoxigenin systems), is being increasingly used. Combined with the detection of hybrid molecules by chemoluminescence, they allow the use of crude sap extracts of infected plants to be used as samples.

A further significant advance in molecular biology was the advent of the polymerase chain reaction (PCR), which involves the enzymatic amplification of a specific target DNA sequence (fig. 4). Once the DNA is amplified, it can be detected by electrophoresis or nucleic acid hybridization. The potential increase in sensitivity provided by the PCR technique has resulted in considerable interest, either for direct detection of organisms or for the development of probes from cloned PCR products. For practical use, any method of diagnosis should be evaluated in terms of sensitivity, specificity, reliability and cost, according to the problem encountered. Whereas technical performance in terms of sensitivity or specificity is not a goal in itself, sensitivity is becoming a priority in certification procedures which require the detection of low levels of pathogens in asymptomatic tissues.

On the other hand, less sensitive, but more specific tests, are generally required for classification and taxonomical studies, managing genetic resources, or detecting strains of pathogens resistant to pesticides.

The PCR procedure using a battery of group-specific primers allows all members of a viral group to be detected by a relatively rapid and simple, yet sensitive, assay. This polyvalent approach does not require any preliminary work of separating or purifying the components of viral complexes, and is therefore particularly useful for quarantine or certification purposes where the primary objective is to identify pathogen-infected samples, whatever the identity of the pathogen involved.

In later stages, the amplified fragments obtained could be cloned into a vector and sequenced by routine procedures for subsequent classification and taxonomical studies, or to develop virus-specific nucleic acid hybridization tests.

Cahiers Agricultures 1994 ; 3 : 217-25.

rieur de la maladie au champ dans un contexte épidémiologique déterminé. Enfin, la précision du contrôle phytosanitaire, mis en œuvre selon des modalités d'échantillonnage statistique, doit répondre aux exigences des échanges internationaux. Les protocoles d'échantillonnage des végétaux (semences, plantes) cherchent essentiellement à réduire le risque de première espèce (accepter un lot alors qu'il est contaminé). Quand son application est possible, l'analyse de groupe permet d'augmenter la précision du test en cherchant à satisfaire également le risque de deuxième espèce (refuser un lot alors qu'il satisfait aux normes phytosanitaires) [22].

Facilité d'emploi et coût d'utilisation des tests de diagnostic

Par sa simplicité, sa rapidité, sa capacité à pouvoir être automatisée, à traiter de grandes séries d'échantillons et, donc, à faire partie des trousseaux de diagnostic, la technique Elisa a apporté une précision et un confort incontestables dans le diagnostic de routine des agents phytopathogènes. À l'opposé, dans le cas des virus à génome d'ARN, la PCR doit être précédée d'une étape de rétrotranscription des ARNs, ce qui exclut actuellement son utilisation à partir de jus bruts de plantes et postule l'obligation d'utiliser des préparations d'ARNs totaux, ou d'acides nucléiques totaux, obtenues à partir des plantes testées, après traitement à la DNase. Ces étapes de purification, préalables à la rétrotranscription, sont incompatibles avec l'utilisation de la PCR pour des tests de diagnostic des virus à ARNs portant sur un nombre élevé d'échantillons. L'immunocapture des particules virales avant l'étape de rétrotranscription, lorsqu'un anticorps est disponible, apporte une solution élégante à ce problème.

Les contraintes d'organisation constituent un critère d'appréciation supplémentaire dans le choix des méthodes de diagnostic à mettre en œuvre. À cet égard, les techniques de diagnostic sur membrane (*dot blot*) permettent une grande souplesse ; les échantillons végétaux peuvent être déposés sur la membrane par les producteurs et envoyés dans un laboratoire centralisé disposant de l'infrastructure nécessaire aux étapes de l'identification et de la révélation à

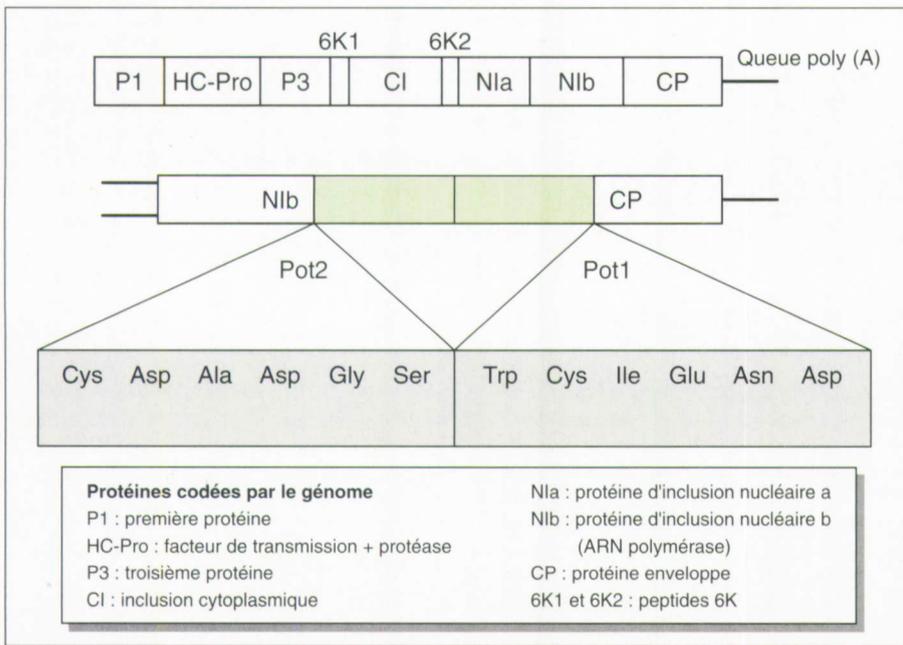


Figure 5. Carte génétique des potyvirus montrant les positions relatives des amorces polyvalentes dégénérées Pot 1 et Pot 2 construites sur la base de deux régions conservées sélectionnées dont la séquence en acides aminés est présentée.

Figure 5. Genetic map of potyvirus showing the relative location of polyvalent degenerated primers Pot 1 and Pot 2 based on 2 selected conserved regions, of which the amino sequence are presented.

l'aide de sondes ou d'anticorps spécifiques.

Les aspects économiques relatifs aux coûts des analyses de diagnostic doivent également être pris en compte. L'objectif peut être de certifier des plantes de haute valeur unitaire telles que des pieds-mères de plantes fruitières ou ornementales. Mais le diagnostic doit parfois être mis en œuvre pour des cultures industrielles à faible valeur unitaire, de sorte que son coût devra être approprié aux différents cas rencontrés.

Conclusion

L'utilisation des tests d'hybridation moléculaire d'acides nucléiques pour le diagnostic en routine des agents phytopathogènes a été freinée jusqu'à une période récente car ils utilisaient des sondes radioactives. La technique PCR et l'utilisation de sondes froides ont considérablement accru les possibilités de

détection et de clonage des acides nucléiques, ce qui a bouleversé l'évolution des techniques pour le diagnostic des agents phytopathogènes.

L'évolution des tests de diagnostic de routine résultera avant tout de déterminants économiques, intégrant non seulement le coût des trousse de diagnostic qui seront commercialisées et la valeur ajoutée des produits végétaux pour lesquels ces trousse seront utilisées, mais aussi le coût de la phase de recherche-développement.

Le recours à l'amplification moléculaire ne satisfait pas aux exigences de simplicité des techniques de diagnostic de routine, mais il constitue une méthode performante d'obtention de sondes moléculaires contribuant à réduire le coût de la recherche-développement. Les retombées de la recherche en biologie moléculaire concernant le séquençage des acides nucléiques d'un pathogène confèrent également une performance nouvelle aux travaux de taxonomie moléculaire, tandis que le clonage du génome d'un pathogène et sa mutagenèse ouvrent de nouvelles perspectives de compréhension

des interactions hôte/parasite et d'identification des facteurs de virulence.

Le secteur de l'identification des agents phytopathogènes ne représente cependant que 10 % des débouchés globaux des techniques de diagnostic, lesquelles sont avant tout commercialisées pour la détection des maladies humaines et animales, pour le contrôle de la qualité des aliments et pour la détection des résidus chimiques ou des contaminants microbiologiques (dans les eaux et le sol). Ceci explique que l'évolution des techniques de détection en phytopathologie sera fonction de leur devenir dans les autres secteurs.

Le marché des trousse de diagnostic des agents phytopathogènes devrait concerner en priorité les productions à haute valeur ajoutée (plantes ornementales et fruitières à multiplication végétative, semences de bases, cultures alimentaires présentant un intérêt commercial important comme la pomme de terre, le bananier), ainsi que les espèces utilisées pour les terrains de loisirs, les pelouses de golf, les espaces sportifs, etc. Les trousse concernées devront satisfaire aux exigences de sensibilité, de spécificité et de rapidité requises par les marchés internationaux des produits végétaux. Le choix des techniques prendra en compte la globalité des problèmes à résoudre ainsi que les modalités de lutte qui pourraient être mises en œuvre.

Sans exclure les techniques classiques de diagnostic, qui resteront sans doute d'application générale pour le contrôle du matériel végétal de consommation, les nouvelles techniques présentées seront exploitées essentiellement au niveau de la production du matériel de multiplication (semences et plants). Les cultures qui échappent aux filières structurées de production et de commercialisation (cultures vivrières locales) risquent donc de ne pouvoir bénéficier des progrès apportés par des techniques de détection des agents pathogènes basées sur l'hybridation moléculaire.

Il est vraisemblable que ces techniques moléculaires déborderont du champ traditionnel de la détection des agents pathogènes (essentiellement la certification) pour concerner les études épidémiologiques, la gestion des facteurs de résistance génétique et la lutte chimique contre les agents phytopathogènes [20] ■

Références

1. Waterworth H. Processing foreign plant germplasm at the National Plant Germplasm Quarantine Center. *Plant Dis* 1993 ; 77 : 854-9.
2. Gennatas J. Les contrôles phytosanitaires à l'importation et à l'exportation des végétaux. *Phytoma* 1990 ; 418 : 16-22.
3. Hansen MA, Wick RL. Plant disease diagnosis : present status and future prospects. *Adv Plant Pathol* 1993 ; 10 : 65-125.
4. Hampton R, Ball E, De Boer, eds. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. A laboratory manual. St Paul : APS Press, 1990 ; 387 p.
5. Lebacqz P. Spécifiques, sensibles et inoffensives : voici les sondes nucléiques non radioactives. *Technoscope de Biofutur* 1987 ; 11 : 12-8.
6. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalkol B, Travis SZ, Fong CKY. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 1983 ; 126 : 32-50.
7. Haber S, Wakarchuk DA, Cvitkovitch S, Murray G. Diagnosis of flame chlorosis, a virus-like disease of cereals, by the detection of disease-specific RNA probes. *Plant Dis* 1992 ; 76 : 590-4.
8. Palkovics L, Burgyan J, Balazs E. Sensitive non radioactive nucleic acid hybridization assay for plum pox virus detection. *IXth International Congress of Virology-Glasgow*, 8-13 August 1993 ; abstract n° 108.
9. Henson JM, French R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann Rev Pl Pathol* 1993 ; 31 : 81-109.
10. Firrao G, Gobbi E, Locci R. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 1993 ; 83 : 602-7.
11. Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravellonandro M, Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J Virol Methods* 1992 ; 39 : 27-37.
12. Nolasco G, de Blas C, Torres V, Ponz F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J Virol Methods* 1993 ; 45 : 201-18.
13. Boligala CR, Olson CJ. Indexing systems for producing clean stock for disease control in commercial floriculture. *Plant Dis* 1985 ; 69 : 189-92.
14. Moyer JW, Salazar LF. Viruses and viruslike diseases of sweet potato. *Plant Dis* 1989 ; 73 : 451-5.
15. Powell CA. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *Phytopathology* 1991 ; 81 : 184-7.
16. Brunt A, Crabtree K, Gibbs A, eds. *Viruses of tropical plants*. Wallingford : CAB International, Melksham, Wiltshire, Redwood Press Ltd., 1990 ; 707 p.
17. Colinet D, Kummert J. Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Virol Methods* 1993 ; 45 : 149-59.
18. Colinet D, Kummert J, Lepoivre P, Semal J. Identification of distinct sweet potato potyviruses in mixed infections by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology* 1994 ; 84 : 65-9.
19. Martin LA, Fox RTV. Use of polymerase chain reaction for the diagnosis of MBC resistance in *Botrytis cinerea*. In : *Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases*. 1992 : 207-14.
20. Coleno A. La contamination des semences et des plantes et les risques agricoles. In : Dacosta Y, éd. *Le repérage précoce des maladies des plantes. Impact et conditions de développement des nouvelles techniques de diagnostic*. Paris : APRIA, 1988 : 43-55.
21. Chevaugon J. Place de la détection et du contrôle dans la stratégie phytosanitaire de demain. In : Dacosta Y, éd. *Le repérage précoce des maladies des plantes. Impact et conditions de développement des nouvelles techniques de diagnostic*. Paris : APRIA, 1988 : 57-71.
22. Shu Geng RN, Campbell N, Carter M, Hills FJ. Quality-control programs for seedborne pathogens. *Plant Dis* 1983 ; 67 : 237-42.

Résumé

L'évolution contemporaine des systèmes de production agricoles et horticoles nécessite la mise en œuvre de techniques de diagnostic des agents phytopathogènes qui soient simples, rapides et sensibles. La technique sérologique Elisa répond à ces différents critères et peut être facilement automatisée : elle a apporté une précision et un confort significatifs dans le diagnostic de routine des agents phytopathogènes. La technologie des acides nucléiques (plus particulièrement l'utilisation des sondes froides et la réaction de polymérisation en chaîne) offre de nouvelles perspectives de développement des tests de diagnostic de routine des virus, viroïdes, mycoplasmes, bactéries, champignons et nématodes phytopathogènes.

Le potentiel d'application des tests de diagnostic doit être évalué en termes de sensibilité, de spécificité et de coût, en relation avec les données de chaque problème à résoudre. La simplicité et la rapidité d'emploi constituent également des critères appréciables dans le choix des méthodes à mettre en œuvre. Les limites et les potentialités des tests de diagnostic des agents phytopathogènes basés sur les techniques immunologiques ou la détection de séquences d'acide nucléique doivent déterminer le choix de l'une ou l'autre méthode pour chaque cas rencontré.