



Projet 2018-2020 - France Bois Forêt, Section Spécialisée Pin maritime, : **Détection du nématode par analyse ADN :** **Diagnostic LAMP**

www.fcba.fr



Projet DIAGNOSTIC rapide – Objectifs et contours

- ✓ **Idée initiale** : Réaliser un diagnostic simplifié de première ligne pour trier à moindre coût les cas suspects
- ✓ **Permet un pré-traitement rapide des cas individuels**
- ✓ **Sans valeur officielle mais avec un renvoi à un labo agréé d'un double des échantillons suspects (signalement légalement obligatoire)**

- ✓ **FINANCEMENT** : FBF – section spécialisée pin maritime, porteur = Caisse Phyto
- ✓ **Timing : 3 ans à partir de 2018**
- ✓ **Base = outils ADN mis au point par Japon et Portugal**
- ✓ **Démarche simplifiée** :
 - Prêt à une future Détection directe sur bois/écorce
 - Outil rapide, verdict visuel : amplification LAMP, sur 2 cibles ADN distinctes

Diagnostic de première ligne pour fluidifier le traitement des cas

- ✓ Le diagnostic officiel exige encore la séparation physique des nématodes d'avec le bois, et ce après incubation longue pour multiplication, ce qui est lourd (lent et coûteux)
- ✓ Idée : méthode plus récente pour une analyse à partir un broyat du bois (copeaux prélevés à la perceuse) avec les nématodes qu'il contient et **analyse immédiate**
- ✓ Hormis cette étape de broyage, l'analyse ADN est basée sur un principe différent : système **LAMP** (technologie années 2010) au lieu du système PCR (technologie datant de 1986)
- ✓ Les deux systèmes visent à recopier sélectivement l'ADN du nématode du pin (*B. xylophilus*) en excluant tout autre nématode (tel que *B. mucronatus*)

Avantage du système LAMP sur la méthode officielle (qPCR)

	LAMP	qPCR
Appareillage	léger	lourd et cher
Sensibilité	+++(+)	++++
Exigence pureté ADN	+/-	++++
Rapidité	++++	++

- ✓ Possibilité de se rapprocher du terrain ... mais pour les 2 systèmes : fantasme de la détection par du personnel non formé et/ou hors local dédié (forêt, atelier scierie...) : point limitant = risque de pollution entre échantillons, d'autant plus que la technique est sensible (aérosols post-diagnostic vers les échantillons à tester...) et que le nématode est détecté
- ✓ **LAMP :Très récemment Adopté pour le COVID (France : homologation HAS 28/11/20, détection ARN salivaire)**
- ✓ **Difficulté dès le début 2020 : en plus des confinements, compétition avec les actions COVID pour les réactifs spécifiques de fournisseurs spécialisés en diagnostic ADN**

Mise en place

- ✓ Notre prise en main des protocoles de détection est basée sur **l'utilisation d'extraits ADN de souches de référence portugaises de nématode du pin** fournis par des sources officielles (le Professeur Marek Tomalak, expert nématologiste spécialiste des nématodes du genre *Bursaphelenchus*, directeur d'une équipe de recherche de l'IPNN à Poznan (homologue polonais du CNRS). **Aucun nématode n'a été transporté.**
- ✓ **Évolution 2020: deux nématodes morts et désinfectés (préparés par le laboratoire de référence du gouv. portugais) ont été utilisés en laboratoire confiné pour simuler la purification d'ADN à partir d'un prélèvement sur un arbre (effets de dilution et inhibition)**
- ✓ **2020 : Récupération de « cousins anodins » de *B. xylophilus* : *B. mucronatus* pour vérifier la spécificité du test**

Résumé voyage Portugal 25-28 Novembre 2019

Guide en Portugais - Cas d'un arbre symptomatique abattu avant prélèvement

- ✓ Prélèvement sur le terrain (100 km au Sud-Est de Lisbonne) avec 3 techniciens + 2 spécialistes superviseurs : démonstration spontanée + correction et commentaires
- ✓ Suivi traitement au labo dont aspects documentaires et administratifs
- ✓ Séparation des nématodes pour le diagnostic visuel
- ✓ Analyse ADN
- ✓ débriefing des erreurs habituelles et autres décalages avec les documents publiés → notes pour mise en œuvre



Figura 7. Colheita de amostras de madeira (continuação).

NOTA: Na amostragem em serrações e fábricas de processamento e tratamento de madeira, todos os tipos de derivados de madeira (madeira serrada em pranchas, ripas, postes, embalagens de madeira, aparas, estilha e casca isolada submetidos a tratamento ou provenientes de países onde

Voyage d'observation au Portugal Novembre 2019

- ✓ **Portugal** : 6 labos de diagnostic sur continent (surface équivalente Nulle Aquitaine) + 2 pour les îles
- ✓ Diagnostic majoritairement visuel **tant que personnel expert disponible** (+ nombreux assistants pour préparer les échantillons): **difficulté de formation/remplacement** des diagnostiqueurs
- ✓ Analyse ADN rarement faite mais en utilisation croissante suite accumulation d'indices montrant les ambiguïtés morphologiques entre *B. xylophilus* et ses cousins, toujours après isolement des nématodes
- ✓ **Visualisation sur gel (lent)**

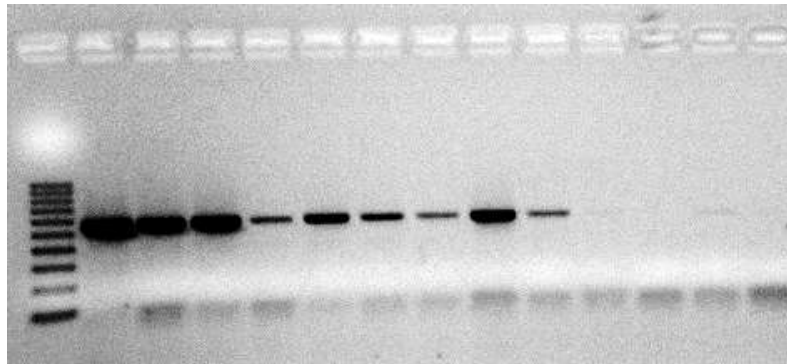


Figure 1 : Aperçu visuel des résultats obtenus avec un des protocoles LAMP testés.

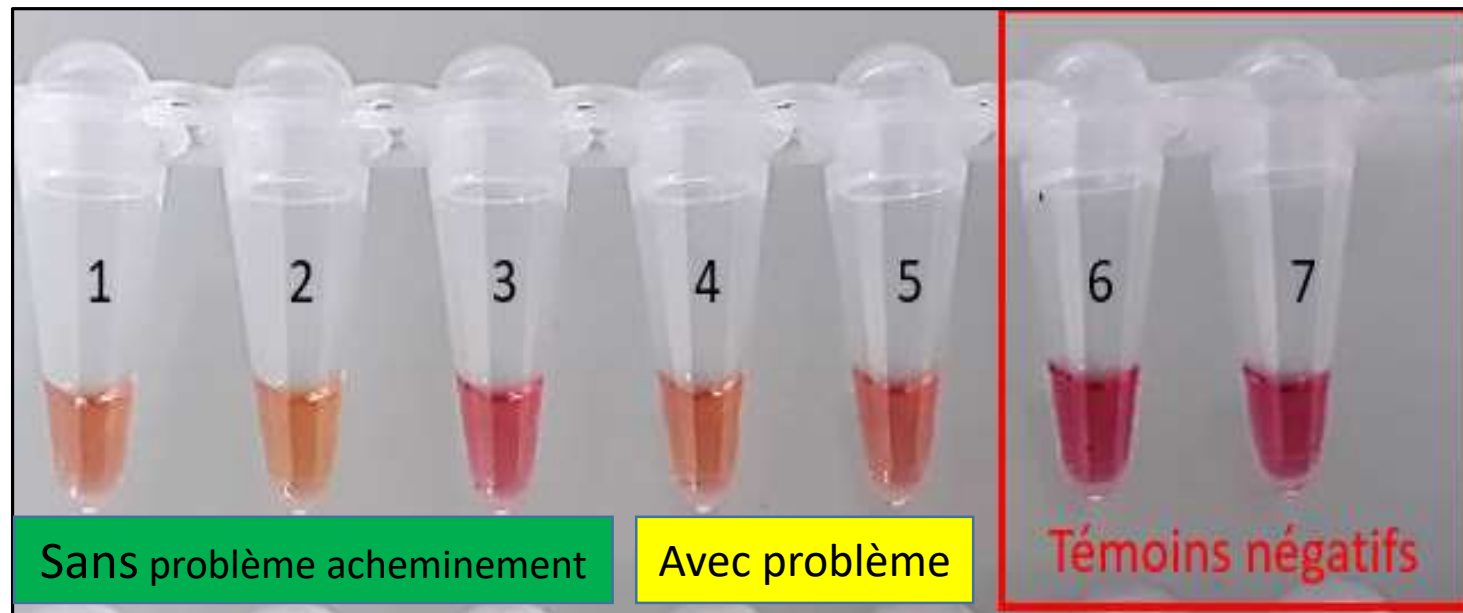
3 souches portugaises de référence de nématode du pin sont utilisées :

- tubes 1 et 4 = souche Pt670L
- tubes 2 et 5 = souche Pt420L
- tube 3 = souche Mad24c (issue de Madère)

Sans (tubes 1 à 3) ou **Avec** (tubes 4 et 5) un traitement thermique préalable simulant un problème de **conservation** (échantillon qui aurait traîné dans de mauvaises conditions de conservation avant son arrivée au laboratoire)

Intensité de la composante JAUNE visible à l'œil nu:

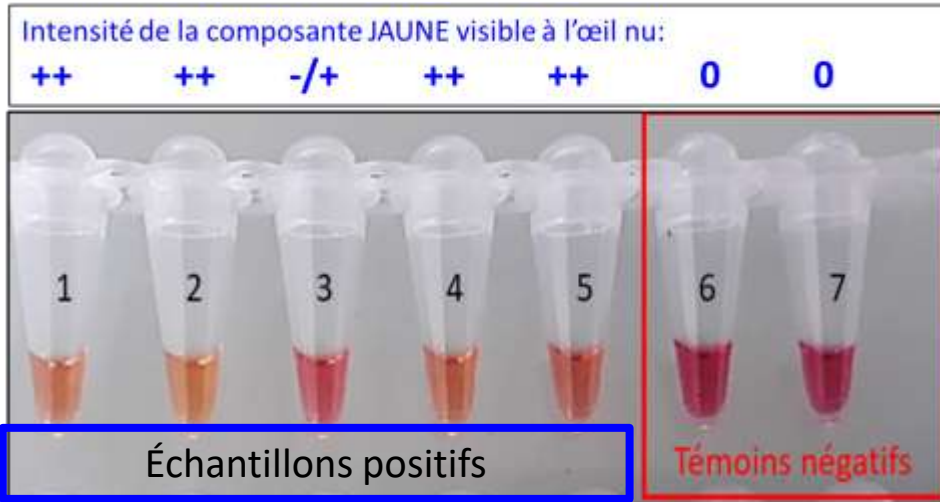
++ ++ -/+ ++ ++ 0 0



Les 7 tubes présentés montrent le résultat de la réaction LAMP ciblant l'ADN de nématode.

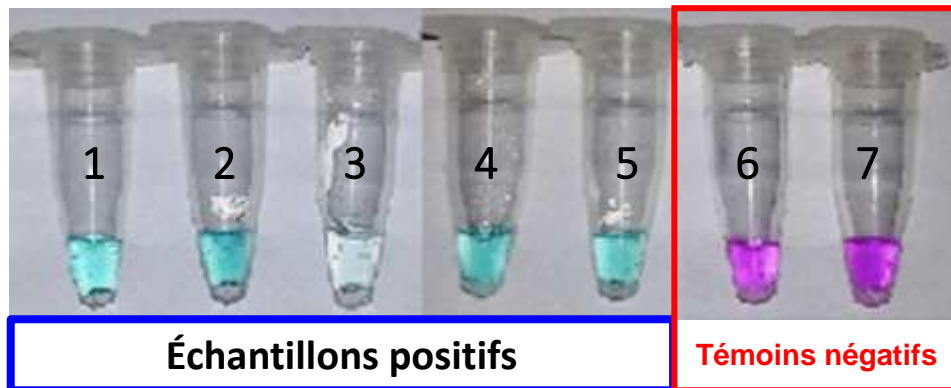
Révéler le résultat sans avoir besoin d'outil de lecture

Résultat obtenu en fin de tranche 1 :



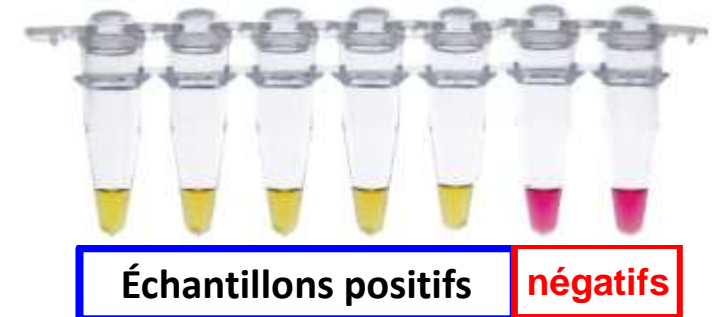
Fin année 1 Amélioration obtenue par l'ajustement de la nature du colorant et de l'équilibre chimique des réactifs : le témoin positif à faible concentration (tube 3) se différencie nettement des témoins négatifs (tubes 6 et 7)

Résultat obtenu en fin de tranche 2 :



Fin année 2

2020 : Utilisation d'un autre colorant



CONCLUSION

- ✓ **Excellent résultats des mises au point labo :**
 - Livrable : se passer de l'outil de lecture ADN : diagnostic visuel direct : **OK** (coloration)
 - Livrable : ajuster le niveau de sensibilité pour éviter les faux positifs : **OK**
 - Livrable : optimiser (simplifier) l'extraction de l'ADN : **OK → vérifié en situation « prototype de diagnostic de terrain » : nématode mort ajouté à du bois**
 - Livrable : vérifier l'absence de signal avec des nématodes anodins: **OK ? (rép. en cours)**
- ✓ Echanges nombreux avec deux laboratoires officiels de références internationaux : INIAV (Portugal) et IPP-NRI (Pologne), un contact préliminaire avec l'ANSES (labo nématode)
- ✓ Dont visite de terrain au Portugal pour suivre toutes les étapes du prélèvement à l'analyse en situation réelle + débriefing des erreurs habituelles et autres décalages avec les documents publiés, dont manuel de prélèvement et analyse en Portugais)

Merci de votre attention

