



Détection du nématode par analyse ADN :

9 décembre 2022

Mathilde Montibus, Karine Durandea, Luc Harvengt
mathilde.montibus@fcba.fr

www.fcba.fr



Projet DIAGNOSTIC rapide – Objectifs et contours

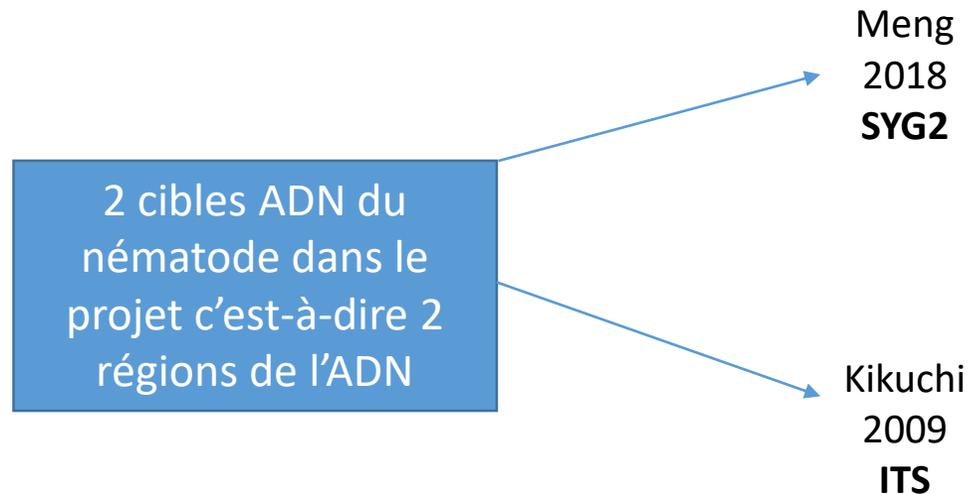
- ✓ Le diagnostic officiel pour le nématode du pin passe par une séparation des individus, une multiplication et un protocole long en laboratoire
- ✓ L'objectif était de réaliser un diagnostic simplifié de première ligne pour trier à moindre coût les cas suspects
- ✓ Permet un pré-traitement rapide des cas individuels
- ✓ Sans valeur officielle mais avec un renvoi à un laboratoire agréé d'un double des échantillons suspects (signalement légalement obligatoire)



Projet DIAGNOSTIC rapide – Objectifs et contours

- ✓ La détection est basée sur un principe différent : système LAMP (technologie années 2010) au lieu du système PCR (technologie datant de 1986)
- ✓ **LAMP : Détection colorimétrique rapide à T°C constante – Visuelle ou fluorescence aux UVs – 1h – Incubation en machine de laboratoire**

Objectif : Cibler *B. xylophilus* en excluant tout autre nématode (tel que *B. mucronatus*), car le diagnostic visuel du nématode n'est pas forcément fiable à 100%



Projet DIAGNOSTIC rapide – ADN souches de *B. xylophilus*

numéro	ID	[C] ng/μL
ADN1	Bx Pt670L DNA	135
ADN2	Bx MAD 24C DNA	48
ADN3	Bx MAD 24C	84
ADN4	Bx Pt 420 L	211
ADN5	Bx Pt 670 L	77

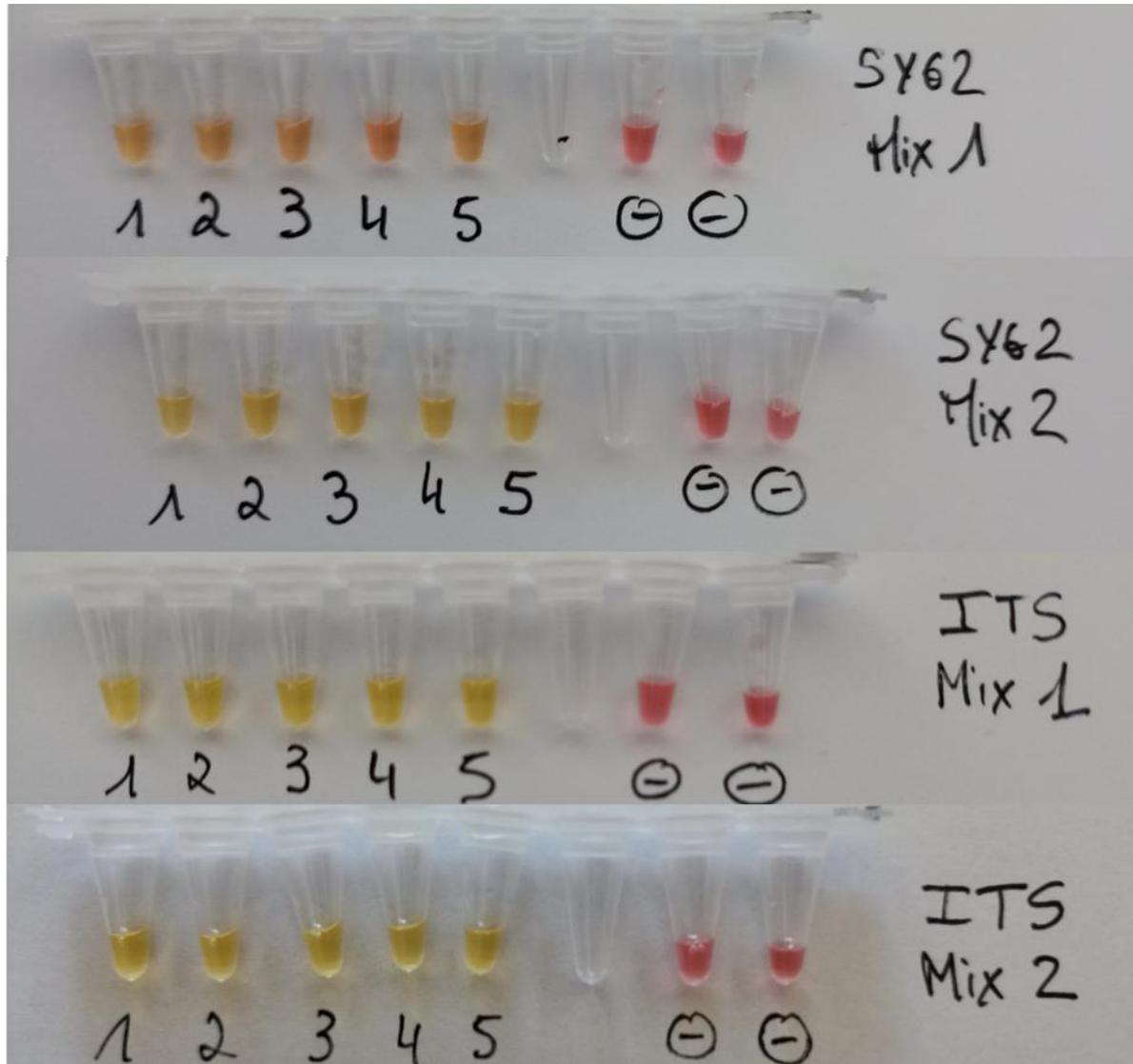
Test 1 : Mise au point du test pour voir si l'ADN de *B. xylophilus* est détectable par un test colorimétrique visuel d'1h

5 ADNs de *B. xylophilus* venant du Portugal à des concentrations normales

PROTOCOLE selon biblio	
65°C	60 min
85°C	5 min
T100 biorad	

Test rapide = 1h d'incubation
Analyse de la couleur à la fin
Rouge = Absence du nématode
Jaune = Présence du nématode

Projet DIAGNOSTIC rapide – ADN souches de *B. xylophilus*



TEST1

Les ADN du nématode Bx sont bien détectés (coloration jaune)

Le test fonctionne pour les 2 régions de l'ADN ciblées et pour toutes les conditions testées mais la condition 2 est plus performante

La manipulation permet la détection en visuel de l'ADN de *B. xylophilus*

Projet DIAGNOSTIC rapide – Distinction des nématodes 10 individus

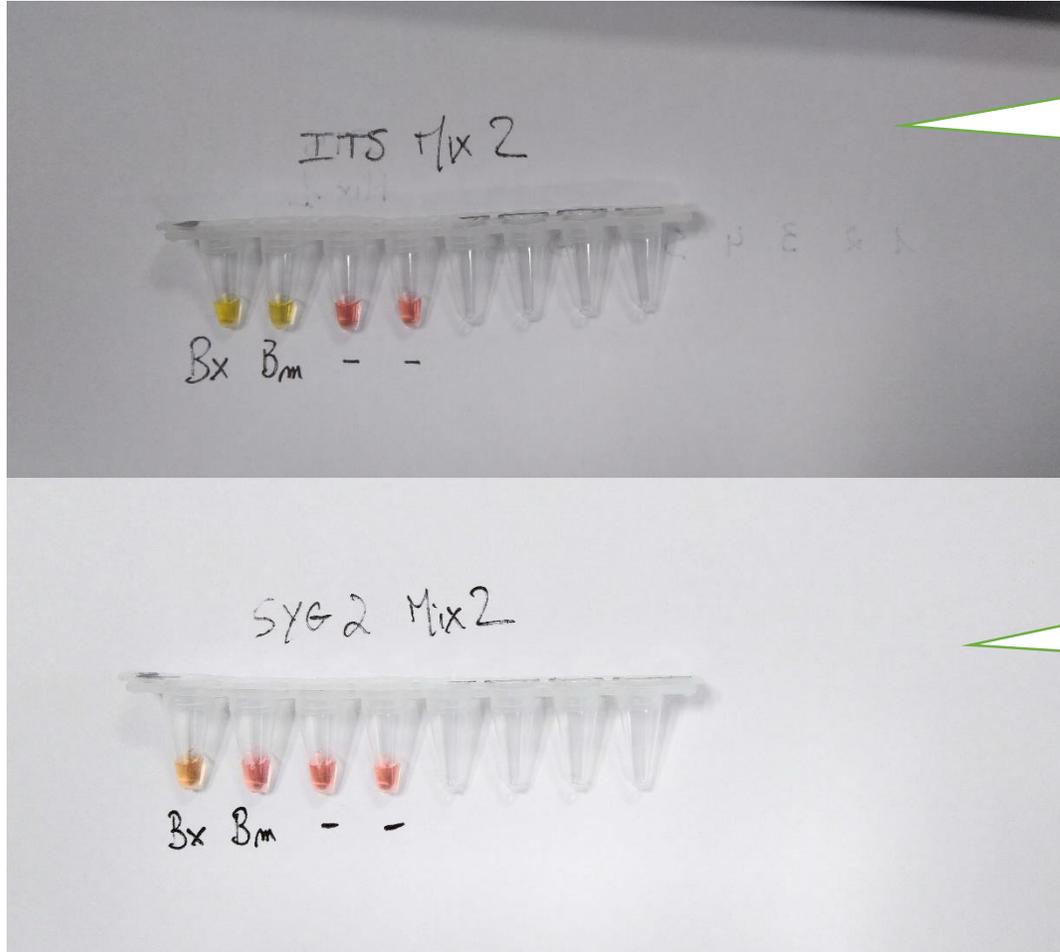
ADNs de 10 individus de *B.xylophilus*
venant du Portugal
ADNs de 10 individus de *B. mucronatus*
venant du Portugal

Test 2 : Test pour voir si les ADNs de 10 individus de *B. xylophilus*
et de *B. mucronatus* sont différenciables par un test
colorimétrique visuel d'1h

PROTOCOLE selon biblio	
65°C	60 min
85°C	5 min
T100 biorad	

Test rapide = 1h d'incubation
Analyse de la couleur à la fin
Rouge = Absence du nématode
Jaune = Présence du nématode

Projet DIAGNOSTIC rapide – Distinction des nématodes 10 individus



CIBLE 1

Les ADN du nématode sont détectés que ce soit Bx ou Bm avec une quantité faible (10 individus) → couleur jaune dans les 2 cas

CIBLE 2

Les ADN du nématode Bm ne sont pas détectés et ceux de Bx sont détectés faiblement avec une quantité faible (10 individus) → coloration orange difficilement différenciable du rouge

La manipulation en colorimétrie ne permet pas la distinction des nématodes entre eux en visuel (quantités faibles 10 individus)

Projet DIAGNOSTIC rapide – ADN de 1 ou de 10 individus de Bx, de Bf et de Bm – Détection UV – ITS

ADNs de 1 ou 10 individus de *B.xylophilus* venant du Portugal
ADNs de 1 ou 10 individus de *B. mucronatus* venant du Portugal
ADNs de 1 ou 10 individus de *B. fraudulentus* venant du Portugal

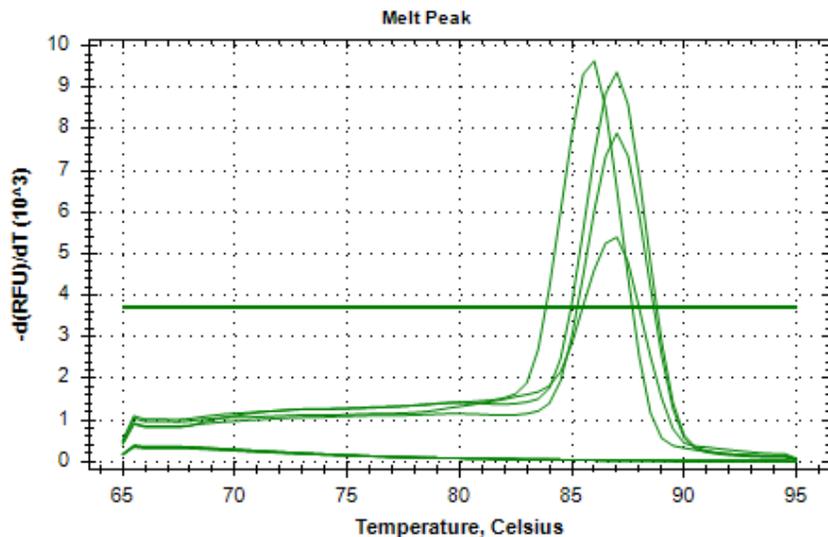
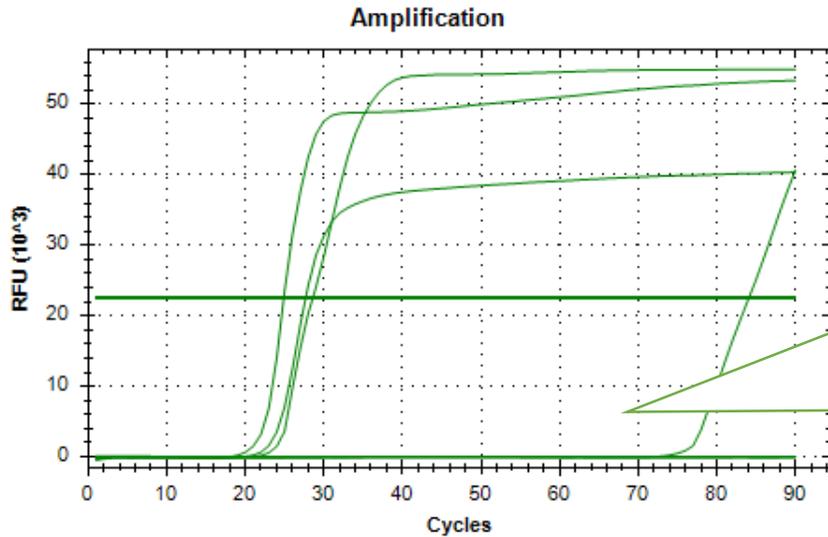
PROTOCOLE selon biblio	
65°C	60 min
85°C	5 min
T100 biorad	

Test 2 : Test pour voir si les ADN de 1 ou 10 individus de *B. xylophilus*, de *B. mucronatus* ou de *B. fraudulentus* sont différenciables par un test à détection UV d'1h (plus sensible que le visuel)

Travail uniquement sur la cible 1 car la plus efficace sur le test précédent

Test rapide = 1h d'incubation
Analyse de la fluorescence à la fin
Corrélation avec la détection ou non du nématode

Projet DIAGNOSTIC rapide – ADN de 1 ou de 10 individus de Bx, de Bf et de Bm – Détection UV – ITS



Les ADN de Bx en grande quantité et pour des quantités faibles sont bien détectés (10 ou 1 individus)

Les autres nématodes ne sont pas détectés ou très tardivement (Bf) quelle que soit la quantité testée

PROTOCOLE selon biblio

65°C 90 min

85°C 5 min

Courbe de fusion en suivi car qPCR

Détection aux UVs spécifiques pour Bx avec la cible ITS

Conclusions

- ✓ **La détection visuelle par colorimétrie de l'ADN de Bx est possible mais la différenciation avec l'ADN d'un autre nématode n'est pas possible → manque de sensibilité de la simple détection visuelle**
- ✓ **La différenciation entre les nématodes Bx, Bm ou Bf est possible avec la détection UV en laboratoire en 1h (sur peu d'individus) → première approche intéressante**
- ✓ **Les tests ont été fait sur des ADNs de souches pures → à valider sur des échantillons complexes et sur un plus grand nombre de répétitions techniques**
- ✓ **Ce test en laboratoire n'est pas transposable au terrain étant donné que la colorimétrie n'est pas assez sensible sur un nombre faible d'individus**