




FCBA
INSTITUT TECHNOLOGIQUE

# Détection du nématode par analyse ADN :

**9 décembre 2022**

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

Avec le soutien de

FRANCE Bois FORÊT — INTERPROFESSION NATIONALE — www.franceboisforet.fr

SECTION SPÉCIALISÉE PIN MARITIME

CAISSE PHYTO FORÊT maison de la forêt

# Projet DIAGNOSTIC rapide – Objectifs et contours

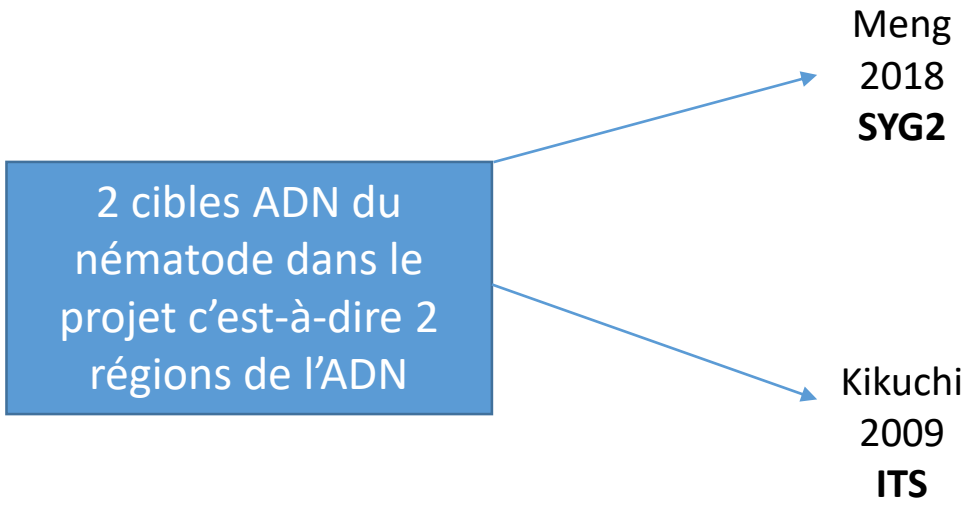
- **Le diagnostic officiel pour le nématode du pin passe par une séparation des individus, une multiplication et un protocole long en laboratoire**
- **L'objectif était de réaliser un diagnostic simplifié de première ligne pour trier à moindre coût les cas suspects**
- **Permet un pré-traitement rapide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

Avec le soutien de
FRANCE BOIS FORÊT INTERPROFESSION NATIONALE www.franceboisforet.fr
SECTION SPÉCIALISÉE PIN MARITIME
CAISSE PHYTO FORÊT maison de la forêt

# 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%




Avec le soutien de
FRANCE BOIS FORÊT
INTERPROFESSION NATIONALE
www.franceboisforet.fr
SECTION SPÉCIALISÉE PIN MARITIME
CAISSE PHYTO FORÊT
maison de la forêt

# 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 |

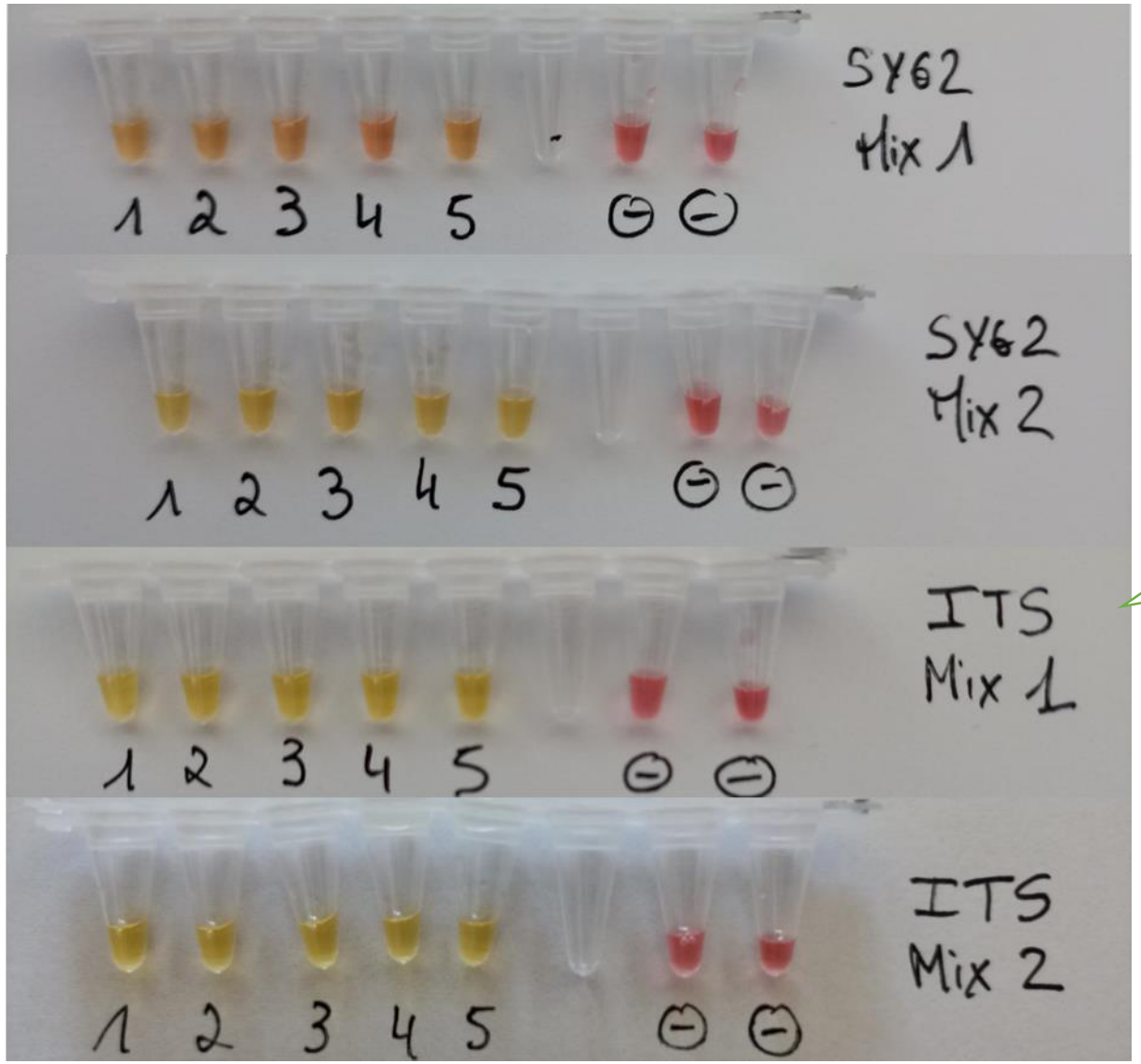
5 ADNs de *B.xylophilus* venant du Portugal à des concentrations normales

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

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

**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

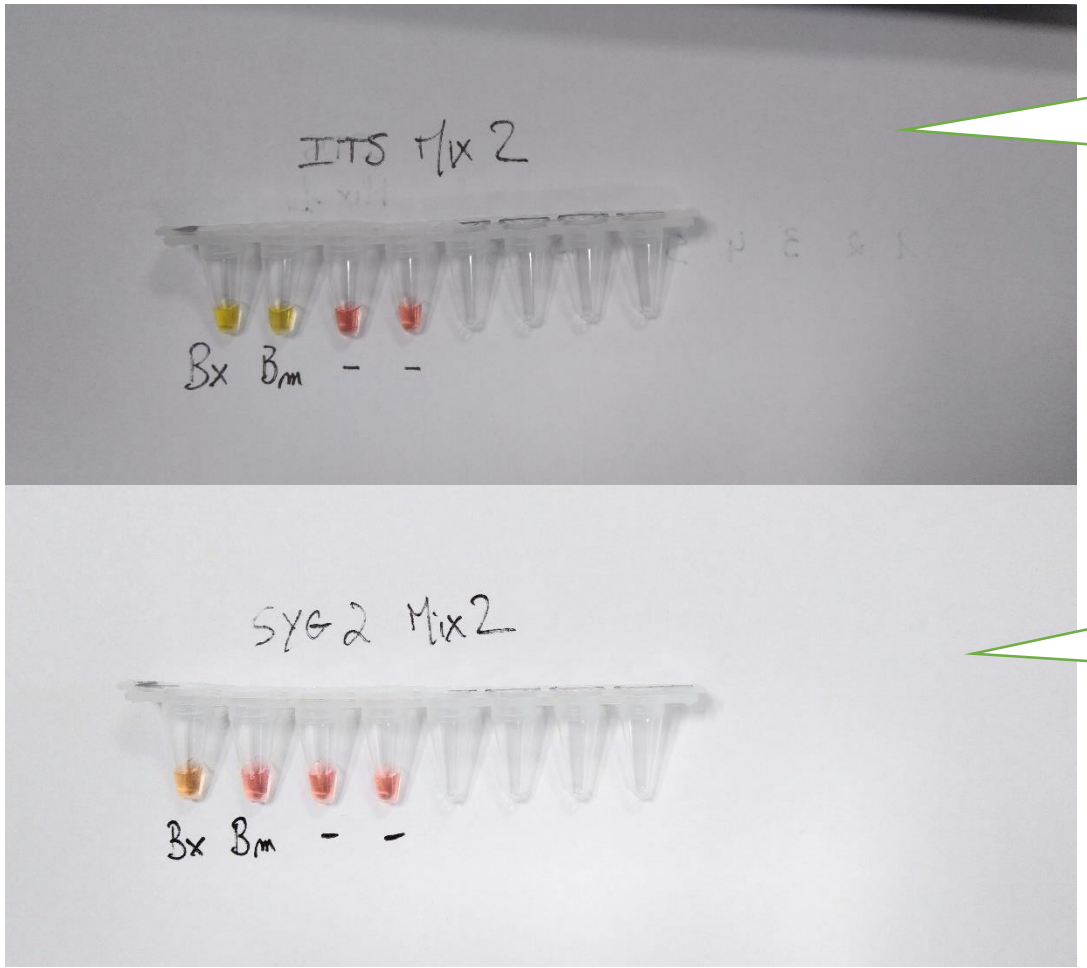
ADNs de 10 individus de *B.xylophilus* venant du Portugal
ADNs de 10 individus de *B. mucronatus* venant du Portugal

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

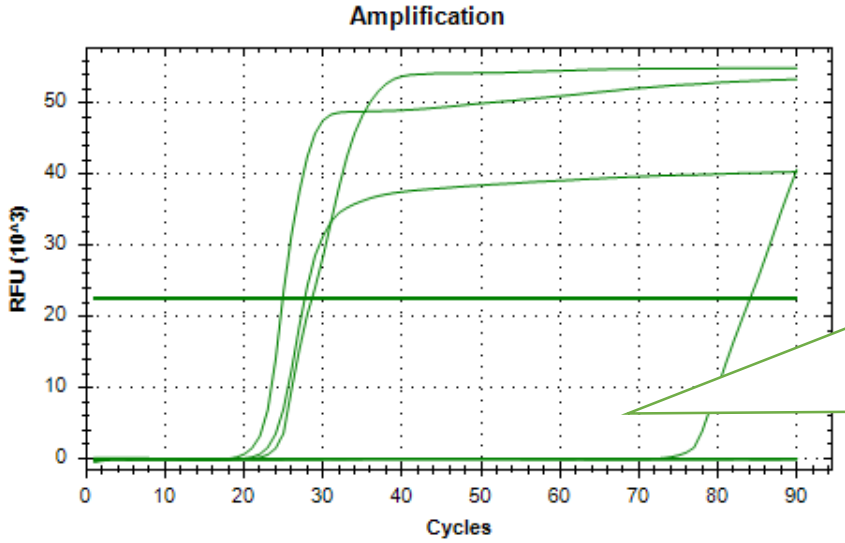
Test 2 : Test pour voir si les ADNs de 1 ou 10 individus de *B. xylophilus,* de *B. mucronatus ou de B. fraudulentus* sont différenciables par un test à détection UV d'1h (plus sensible que le visuel)

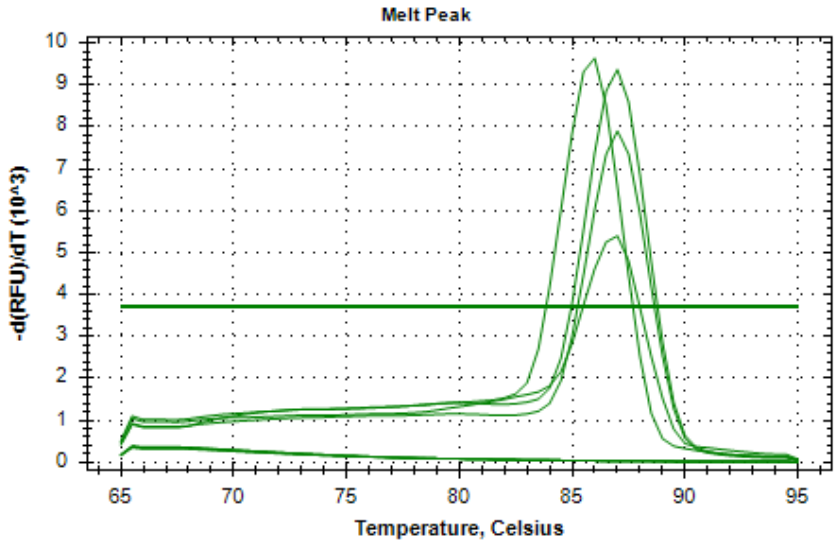
Travail uniquement sur la cible 1 car la plus efficace sur le test précédent

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

**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 détectées (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 différentiation avec l'ADN d'un autre nématode n'est pas possible ➔ manque de sensibilité de la simple détection visuelle

- La différentiation 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