

Diagnostic moléculaire à haut débit pour détecter les viroses des plants de pomme de terre

Olivier Schumpp, Brice Dupuis, Amanda Bréchon, Werner Wild, Peter Frei, Didier Pellet et Santiago Schaerer
 Agroscope, Institut des science en production végétale, 1260 Nyon, Suisse
 Renseignements: Olivier Schumpp, e-mail: olivier.schumpp@agroscope.admin.ch



Prélèvement d'une pelure sur le talon du tubercule.

Introduction

Plusieurs maladies virales présentes sur toutes les zones de production de la planète affectent sévèrement le rendement et la qualité de la production de pommes de terre (Valkonen 2007). En Suisse, les virus les plus dommageables pour la production de pommes de terre sont principalement le virus Y de la pomme de terre (PVY)

et, dans une moindre mesure, le virus de l'enroulement (PLRV) (Steinger *et al.* 2014). Ces deux virus sont transmis par des espèces très diverses de pucerons (Verbeek *et al.* 2010; Basky 2002). Sous leur forme ailée, ces insectes vecteurs de maladies sont très mobiles et capables de disséminer ces virus de plante à plante. Le PVY est un virus dit **non persistant**, ce qui signifie que les pucerons peuvent acquérir le virus sur une plante malade en quelques secondes et le transmettre immédiatement aux plantes voisines. Cette rapidité de transmission rend l'usage d'insecticides inefficace car le puceron est capable de transmettre le virus avant de subir les effets du produit (Perring *et al.* 1999). Dès les années soixante, une stratégie de lutte basée sur la distribution de plants certifiés et sains a été mise en place en Suisse et a permis de multiplier par 1,7 les rendements à l'hectare en quelques années (Keller et Bérce 1966). Initialement basée sur l'inoculation de plantes indicatrices avec les tubercules à tester, cette méthode laborieuse a été remplacée par la méthode immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en 1984 (Gugerli et Gehrig 1980). Cette méthode n'est toutefois pas assez sensible pour pouvoir détecter le PVY dans les tubercules directement après la récolte et il est nécessaire d'activer préalablement la multiplication du virus dans les tubercules avant de procéder à l'analyse. Deux méthodes permettent d'atteindre des concentrations virales détectables par ELISA. La première lève la dormance des tubercules par l'application d'un gaz (rindite ou bromoéthane) directement sur les pommes de terre. La seconde requiert la mise en culture de tubercules traités par une hormone végétale liquide (acide gibbérellique). L'une implique la manipulation de gaz toxiques, mais permet une analyse ELISA directement sur les tubercules, et l'autre est réalisée sur les feuilles des jeunes plantules et nécessite une grande quantité de main d'œuvre ainsi que des surfaces de serre importantes pour cultiver les plantes. Dans les deux cas, activer la multiplication du virus est un processus long, qui retarde la remise des résultats de quatre à huit semaines.

Agroscope a développé une méthode alternative capable de détecter la présence des virus directement sur tubercules dormants, juste après leur récolte. Cette méthode est basée sur la PCR en temps réel, ou *real time* RT-PCR, une technique d'analyse moléculaire 10^5 à 10^7 fois plus sensible que l'ELISA (Kogovsek *et al.* 2008). Rapide, sûre et très évolutive, cette méthode a été développée et progressivement validée depuis 2013. En 2016, l'intégralité des lots de pomme de terre de semence produits en Suisse a été analysée par *real time* RT-PCR. Cet article présente les techniques et la stratégie analytique de cette chaîne d'analyse capable de traiter plusieurs centaines de milliers de tubercules en quelques semaines.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Pour chaque lot analysé, 200 tubercules sont prélevés dans des parcelles de multiplication de plants de pomme de terre (fig. 1). Des pelures d'environ 250 mg sont prélevées au talon des tubercules dormants, en incluant le stolon. Après cicatrisation de la zone de prélèvement, ces mêmes tubercules sont ensuite traités à la rindite et analysés par ELISA (Gugerli et Gehrig 1980).

Extraction des acides nucléiques et analyse par RT-PCR

Les pelures sont regroupées par 25 dans des sachets de broyage développés et produits par Agroscope. Ces sacs de 24×28 cm en plastic PA/PE 70/120 contiennent une gaze thermosoudée aux parois intérieures, pour permettre le broyage fin des pelures par friction. Ce broyage est effectué en passant les sacs dans une presse à cylindres spécialement développée par Agroscope à cet effet (fig. 2). Le tampon d'extraction (Roehorst *et al.* 2005) est ajouté après le broyage et immédiatement homogénéisé (Homex 6, Bioreba AG). 1 ml d'homogénat par sachet est transféré dans des plaques 96 puits (fig. 1). Toutes les étapes suivantes, portant sur l'extraction des ARN et l'analyse par *real time* RT-PCR, sont réalisées avec

Résumé ■ Chaque année, Agroscope contrôle l'absence de virus dans près de 300 000 tubercules pour la certification des plants de pomme de terre destinés aux producteurs suisses. Depuis 2016, ce contrôle est réalisé par PCR en temps réel, ou *real time* RT-PCR, directement après la récolte, sur des tubercules dormants. Cette évolution permet d'obtenir des résultats plus rapidement et dispense de l'utilisation de traitements chimiques toxiques et polluants utilisés pour lever la dormance. La nouvelle chaîne analytique développée par Agroscope a été validée pendant trois ans sur des dizaines de lots et près de 15 000 tubercules. Elle offre la possibilité de contrôler la bonne réalisation de chaque étape de l'analyse et peut facilement s'adapter à la détection d'autres types de microorganismes susceptibles d'affecter la qualité des plants de pomme de terre.

le même type de plaques. Un extracteur KingfisherFlex (Thermo Fisher Scientific) est utilisé pour purifier les acides nucléiques à partir de 75 μ l d'homogénats de pelure. Les réactifs d'extraction utilisés (MagMAX Pathogen RNA/DNA, Thermo Fisher Scientific) permettent l'extraction des ARN dans 100 μ l de tampon d'élu-tion. 3 μ l d'acides nucléiques sont directement utilisés dans une réaction PCR de 15 μ l (QuantiFast Pathogen, Qiagen). Le PVY et le PLRV ont été recherchés sur tous les extraits nucléiques par une réaction PCR en triplex, incluant les amorces du PVY (Kogovsek *et al.* 2008), les amorces du PLRV (Agindotan *et al.* 2007) et les amorces du contrôle interne d'amplification (Internal Amplification Control, Qiagen). Les autres viroses mineures de la pomme de terre présentes en Suisse (tabl. 1) sont détectées par *real time* RT-PCR ou par RT-PCR classique pour le *potato mop-top virus* (PMTV), sur des extraits d'ARN

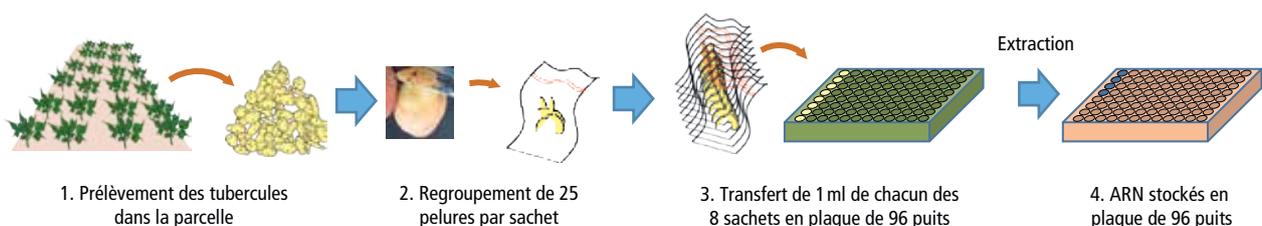


Figure 1 | De la parcelle à l'ARN. La certification des lots de plants de pomme de terre se base sur l'analyse de 200 tubercules prélevés au champ dans les parcelles de multiplication (1). Une pelure est prélevée sur le talon de chaque tubercule. Elles sont regroupées en 8 sachets de broyage de 25 pelures, pour produire 8 «homogénats» (2). Un millilitre de chacun de ces 8 homogénats est transféré dans des plaques en plastique composées de 96 puits (3). Le format de ces plaques permet l'extraction des ARN (4), puis leur analyse semi-automatisée.

Lexique | Le diagnostic moléculaire

ARN

Les génomes des virus de plantes présents dans les feuilles ou les tubercules sont principalement constitués de molécules d'ARN. Il est nécessaire d'extraire (ou purifier) ces ARN pour en déterminer la séquence.

Assemblage *de novo*

Processus qui vise à associer les séquences issues du séquençage profond pour former des contigs.

Cartographie de séquences

Les séquences issues du séquençage profond sont très nombreuses mais courtes. Cartographier un génome consiste à tenter de disposer les séquences le long d'un génome de référence à la façon d'un puzzle. Si l'intégralité d'un génome de référence est recouverte par ces petites séquences, cela confirme que le virus est présent dans l'extrait. Si seule une portion du génome est couverte par des séquences, il est possible que le virus soit détecté par erreur. Cela peut se produire si une zone de son génome ressemble à une autre séquence génétique réellement présente dans l'extrait.

Contigs

Ensemble de séquences identifiées par séquençage profond. Elles sont associées les unes aux autres lorsqu'une partie d'une séquence est identique à la partie d'une autre séquence. Avec un chevauchement de 10 à 100 nucléotides, deux séquences de 100 nucléotides de long peuvent former un contig de 100 à 190 nucléotides de long.

Diagnostic Moléculaire

Processus d'identification basé sur la détection d'une séquence génétique connue. Le plus souvent, il repose sur l'utilisation de méthodes de PCR ou de séquençage.

PCR

Réaction dite «de polymérisation en chaîne». Elle multiplie très spécifiquement une séquence génétique par 12 ordres de grandeur (i.e. 1000 milliard). Si la séquence génétique recherchée est présente dans l'échantillon, le résultat de son amplification est observé par fluorescence.

Génome

Information génétique complète d'un organisme. A l'image d'un texte constitué d'une suite de lettres, un génome est une suite (une séquence) de nucléotides.

Séquençage profond

Technologie de séquençage permettant de déterminer la séquence génétique de plusieurs centaines de millions d'ARN présents dans un extrait, en une seule réaction. Le séquençage profond opère sans connaissance préalable du matériel génétique contenu dans l'extrait.

Real time RT-PCR

Méthode PCR qui détecte les molécules d'ARN. Elle est dite *real time* ou «en temps réel» car le résultat est lisible directement sur un écran. La RT-PCR classique nécessite une opération de «révélation» à la fin de l'analyse. Elle est plus fastidieuse à mettre en place.

Tableau 1 | Les virus de la pomme de terre

| Acronyme | Nom | Conséquences | Statut légal |
|----------|---|--|----------------------------|
| PVY | Virus Y de la pomme de terre | Diminue gravement le rendement et la qualité des tubercules | Organismes réglementés |
| PLRV | Virus de l'enroulement de la pomme de terre | | |
| PVA | Virus A de la pomme de terre | | |
| PVM | Virus M de la pomme de terre | | |
| PVS | Virus S de la pomme de terre | | |
| PVX | Virus X de la pomme de terre | Viroses dites «mineures». Affecte le rendement. Peu ou pas de symptômes sur feuilles | Organismes réglementés |
| PMTV | Virus du Mop Top de la pomme de terre | | |
| TRV | Virus du rattle du tabac | | |
| | | Diminue la qualité des tubercules. Pas de symptômes sur feuilles | Organismes non réglementés |

regroupés selon la procédure décrite dans la figure 3. L'ensemble des manipulations est réalisé par un système robotisé de manipulation de liquides Biomek FX (Beckman) équipé d'un bras à huit canaux indépendants et d'un second bras porteur d'une tête à 96 embouts.

Analyse ELISA

Les analyses ELISA sont toutes réalisées sur des tubercules individuels selon Gugerli et Gehriger (1980).

Séquençage profond

376 extraits d'ARN ont été regroupés de façon pyramidale pour former un extrait d'ARN unique (fig. 3), utilisé pour construire une librairie de séquençage. Cette librairie a été analysée sur une plateforme Illumina HiSeq par séquençage des 125 premières paires de bases



Figure 2 | Presse à cylindres et sac de broyage pour le broyage de 25 pelures. Les 25 pelures contenues dans un sac de broyage sont broyées en quelques secondes par un passage unique dans la presse à cylindres.

de 150 millions d'ARN. Les séquences ont été assemblées en contigs en utilisant les logiciels Velvet et Oasis. La séquence de chaque contig a été comparée aux séquences disponibles dans la banque de données NCBI par BLAST. Les contigs homologues à des séquences virales permettent d'identifier des virus «candidats», potentiellement présents dans les extraits d'ARN. Ces résultats ont été validés une première fois par cartographie de toutes les séquences Illumina sur le génome complet de chacun des virus candidats. Un pourcentage de couverture du génome élevé et la distribution d'un grand nombre de séquences sur l'ensemble du génome sont des critères qui confortent la détection des virus concernés. Une deuxième validation des candidats est réalisée par *real time* RT-PCR en identifiant les extraits d'ARN contenant ces virus.

Résultats et discussion

La chaîne d'analyse et la stratégie de regroupement

La chaîne d'analyse présentée dans cet article permet l'analyse moléculaire des virus dans les tubercules de pomme de terre dormants. La stratégie de regroupement par 25 et les méthodes mises en place visent à optimiser les coûts et assurer un haut débit d'analyses de façon compatible avec les seuils de tolérance de classes édictés par l'ordonnance suisse sur les semences et les plants des espèces de grande culture (ordonnance du DEFR 916.151.1). Les pelures prélevées sur les 200 tubercules de chacun des lots sont rassemblées et broyées par groupe de 25 pour produire huit extraits végétaux ou homogénats. Ces huit homogénats peuvent être

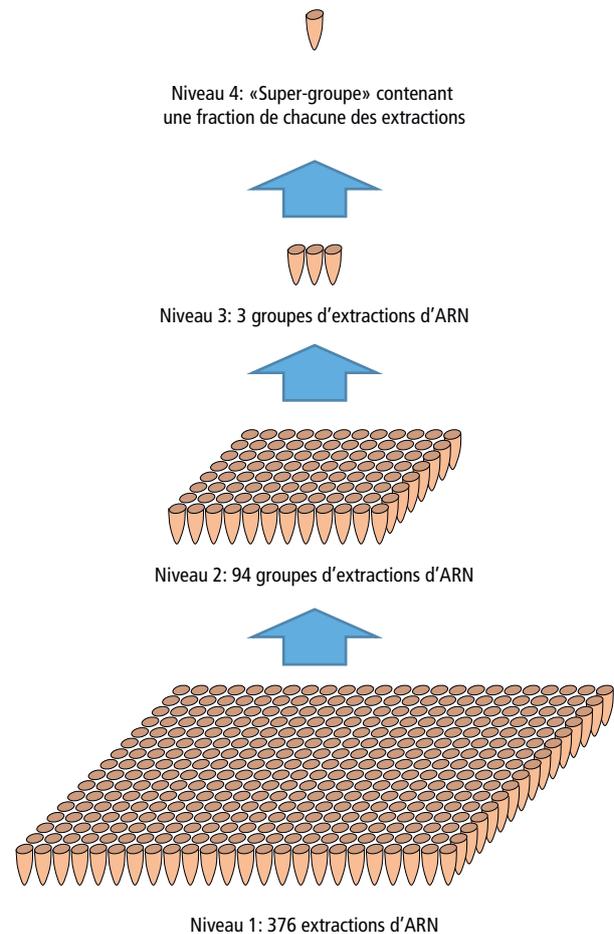


Figure 3 | Assemblage pyramidal des extraits d'ARN. 20 ml de chacune des extractions d'ARN du niveau 1 sont regroupés au niveau 2, puis du niveau 2 au niveau 3 jusqu'à former un «super-groupe» unique au niveau 4. Le séquençage profond présenté dans cet article est réalisé sur le «super-groupe» du niveau 4. Les analyses *real time* RT-PCR pour identifier les extraits contenant les différents virus recherchés se font par étapes, niveau par niveau. Les extraits de niveau inférieur, réunis dans un groupe donné, ne sont analysés individuellement pour la présence d'un virus que si le groupe lui-même donne un signal positif pour la présence de ce virus.

conservés plusieurs mois à -20°C sans dégradation des acides nucléiques. $37,5 \mu\text{l}$ de ces huit homogénats sont regroupés en quatre groupes de deux extraits avant l'extraction des acides nucléiques. Les quatre extractions d'acides nucléiques obtenus contiennent donc les ARN des pelures de 50 tubercules. Ils sont analysés par *real time* RT-PCR. Un traitement statistique des résultats par l'application SeedCalc développée par l'*International Seed Testing Association* (ISTA) permet d'obtenir 5 valeurs de taux d'infection (fig. 4). A 1,4%, les huit extraits végétaux du lot sont ré-analysés sans regroupement pour fournir d'avantage de valeurs statistiques autour du seuil de tolérance de la classe des tubercules de base.

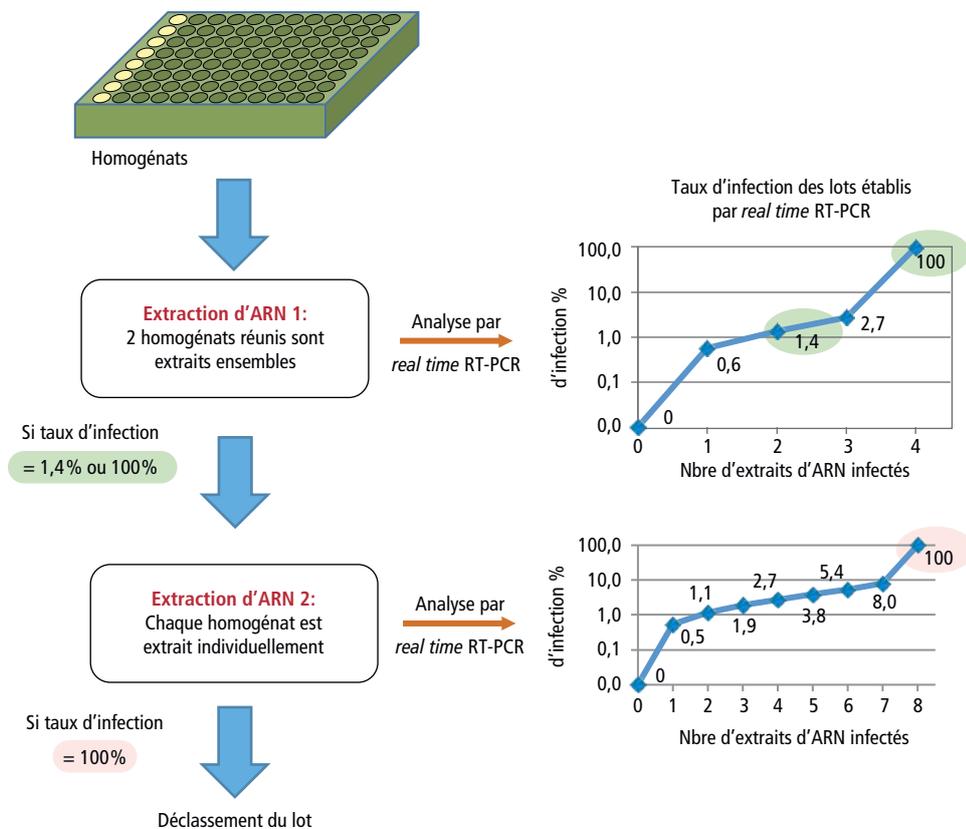


Figure 4 | Extraction des ARN en deux temps. Les ARN sont extraits à partir des 8 homogénats, réunis deux à deux, pour l'extraction et l'analyse. Si le taux d'infection calculé est de 1,4% ou 100%, les 8 homogénats sont extraits une deuxième fois mais individuellement puis analysés. Cette procédure permet d'obtenir les valeurs légales de seuils de tolérance de classes tout en optimisant les coûts d'analyse.

A 100%, lorsque les quatre extraits sont positifs, les huit extraits végétaux du lot sont également ré-analysés sans regroupement pour étendre la gamme de lecture des pourcentages d'infection vers le haut (fig. 4).

L'étape de prélèvement des échantillons sur les tubercules nécessite une main d'œuvre proportionnelle au nombre de tubercules, mais les étapes suivantes, dont le broyage des pelures, l'extraction des ARN et l'analyse par *real time RT-PCR*, sont des étapes automatisées ou partiellement automatisées. La capacité de traitement de l'équipement technique actuellement en place est de 10000 à 20000 tubercules par jour. La production d'homogénats de tubercules est réalisée en quelques secondes dans des sacs de broyage jetables comme expliqué plus haut. Les ARN produits sont conservés sans limite de temps à -80°C pour des analyses ou des vérifications ultérieures.

Cette stratégie de regroupement basée sur un échantillonnage de 200 tubercules a été appliquée à 76% des lots de pommes de terre de semence produits en Suisse en 2016. La taille de l'échantillon de départ (*i.e.* le nombre

de tubercules testés) et le niveau de regroupement des pelures ont été ajustés, à la demande de la profession, pour certains lots. Des lots de classes élevées ou peu sensibles ont été analysés sur une base de 96 tubercules distribués en huit groupes de 12 pelures. D'autres lots de variétés sensibles ont été analysés sur une base de 296 tubercules distribués en huit groupes de 37 pelures. Compte tenu des taux d'infection moyens observés en Suisse au cours des dix dernières années, une stratégie d'analyse en deux étapes – analyse en 4×50 puis en 8×25 – permet une économie substantielle du coût des analyses.

Comparaison ELISA et *real time RT-PCR*

La validation de la *real time RT-PCR* a été réalisée progressivement sur un nombre croissant de lots en 2013, 2014 et 2015. Un premier groupe de 600 tubercules (tabl. 2), soit six lots indépendants, a servi à une analyse comparative entre ELISA et *real time RT-PCR*. Chaque tubercule a été numéroté et échantillonné deux fois pour être analysé individuellement avec chacune des méthodes de dé-

tection (ELISA et PCR). Cinq des six lots aboutissent à la même décision de classement. Deux tubercules d'un lot cv. Alexandra classés sains par ELISA mais diagnostiqués infectés par *real time* RT-PCR aboutissent à une décision de classement différente selon la méthode utilisée. Les résultats présentés dans le tableau 3 comparent l'analyse de 47 lots de 200 tubercules en groupes de 25 par *real time* RT-PCR et l'analyse individuelle des 9400 tubercules par ELISA. L'analyse individuelle – utilisée en ELISA – pour déterminer le pourcentage d'infection d'un lot de 200 tubercules fournit des valeurs de pourcentage discrètes, multiples de 0,5. Le traitement statistique des groupes de 25 utilisé avec la *real time* RT-PCR fournit des valeurs présentées dans la figure 4 et qui ne sont pas des multiples de 0,5. En conséquence, un même nombre de tubercules infectés produit des valeurs numériques de contamination légèrement différentes selon la méthode, et cela indépendamment de la technique de détection elle-même. Compte tenu de cette réserve, 29 lots donnent des résultats d'analyse quasi identiques. Douze lots présentent des différences faibles n'affectant pas le classement du lot et six lots subissent une décision de classement différente selon la méthode utilisée. Les différences de taux d'infection entre les deux méthodes sont faibles mais se situent de part et d'autre du seuil de tolérance séparant la dernière classe de plants de base de la classe des tubercules dits certifiés (classe A). Au vu des milliers de tubercules analysés, les différences sont rares et les deux techniques produisent des résultats fiables et très comparables.

Diagnostic des viroses rares en Suisse

Plusieurs virus rares peuvent infecter le plant de pomme de terre. Certains, dont le PVA, le PVM, le PVS ou le PVX, sont réglementés et doivent faire l'objet d'une analyse. D'autres, représentent une menace dans certains secteurs de l'agriculture. Enfin, le diagnostic des viroses rares présente un intérêt pour le suivi épidémiologique et l'évaluation de la qualité sanitaire de la culture de pomme de terre à l'échelle du pays.

Afin d'évaluer la pertinence du regroupement d'un grand nombre de lots pour suivre les viroses rares par séquençage profond (*Deep Sequencing*) sur plateforme Illumina, 376 extraits d'ARN issus de 50 tubercules et produits à partir de 94 lots de 200 tubercules ont été analysés. Ces extraits ont été rassemblés en plusieurs niveaux de regroupement selon le schéma de la figure 3. Le séquençage profond a produit 150 millions de séquences obtenues à partir de l'extrait total issu du regroupement des 376 extraits initiaux. L'assemblage *de novo* avec les logiciels Velvet et Oasis a produit plus de 40000 contigs

d'une longueur moyenne de 439 paires de base. La comparaison de ces contigs avec les séquences disponibles dans la base de données NCBI a identifié cinq virus, présentés dans le tableau 4. La cartographie des séquences Illumina sur les génomes complets de ces virus produit une couverture de génome supérieure à 99% pour le PVY, le PLRV, le PVX et le PVS. Les trois parties du génome du PMTV présentent une couverture plus faible, de 96, 48 et 40%.

Une recherche de la présence de ces virus par *real time* RT-PCR, menée dans les différents regroupements d'extraits d'ARN, a permis d'identifier le nombre d'extraits infectés par chacune des viroses détectées lors du séquençage profond (tabl. 4). Le virus PVX a été identifié dans deux extraits d'un même lot, le PMTV dans dix extraits répartis parmi cinq lots et le PVS dans 16 extraits issus de huit lots. L'analyse systématique de routine des virus PVY et PLRV de ces 94 extraits par *real time* RT-PCR a identifié 131 extraits issus de 57 lots, et 14 extraits issus de dix lots respectivement, infectés par l'un ou l'autre de ces deux virus.

La détection du PVX, présent dans seulement deux des 376 extraits d'ARN (0,5%), avec une couverture de 99,6% du génome témoigne de la très grande sensibilité de cette technique lorsqu'elle est appliquée à la détection des virus de la pomme de terre.

Contrôle qualité du diagnostic de routine

La *real time* RT-PCR et l'ELISA sont des méthodes de détection dites «avec *a priori*»: seules les souches connues et caractérisées peuvent être détectées par ces deux méthodes. Pour sécuriser le processus de certification vis-à-vis de l'émergence de nouvelles souches virales, le

Tableau 2 | Comparaison de la méthode *real time* RT-PCR avec la méthode ELISA sur des tubercules individuels. La limite légale du seuil de tolérance de la classe de base est fixée à 1,1% maximum. Un lot d'Alexandra subit une décision de classement plus sévère avec la *real time* RT-PCR. Il est repoussé en classe «certifiée».

| N° d'échantillons | Variété | Real time RT-PCR | | % d'infection ELISA | Décision | |
|-------------------|-----------|------------------|------|---------------------|------------------|-----------|
| | | Nbre | % | | Real time RT-PCR | ELISA |
| 1 | Agria | 0/100 | 0,0% | 1,0% | Base | Base |
| 2 | Désirée | 1/100 | 1,0% | 0,0% | Base | Base |
| 3 | Alexandra | 3/100 | 3,0% | 1,0% | Certifiée | Base |
| 4 | Innovator | 7/100 | 7,0% | 7,0% | Certifiée | Certifiée |
| 5 | Amandine | 2/100 | 2,0% | 2,0% | Certifiée | Certifiée |
| 6 | Nicola | 1/100 | 2,0% | 1,0% | Base | Base |

Tableau 3 | Comparaison de la méthode ELISA et de la méthode *real time* RT-PCR (avec traitement statistique). Les homogénats de plusieurs lots ont été analysés une deuxième fois pour fournir d'avantage de valeurs statistiques autour de la valeur seuil de tolérance de la classe des tubercules de base, établie à 1,1%.

| Numéro de lot | <i>Real time</i> RT-PCR (Extraction 1, voir fig. 4) | | <i>Real time</i> RT-PCR (Extraction 2, voir fig. 4) | | % d'infection ELISA | Décision | |
|---------------|--|--------|--|------|------------------------|-------------------------|-----------|
| | Nbre | % | Nbre | % | | <i>Real time</i> RT-PCR | ELISA |
| 1 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 2 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 3 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 4 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 5 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 6 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 7 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 8 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 9 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 10 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 11 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 12 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 13 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 14 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 15 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 16 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 17 | 0/4 | 0,0% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 18 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,0% | Base | Base |
| 19 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 20 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 21 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 22 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 23 | 1/4 | 0,6% | 1/8 | 0,5% | 0,5% | Base | Base |
| 24 | 1/4 | 0,6% | 1/8 | 0,5% | 0,5% | Base | Base |
| 25 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 26 | 1/4 | 0,6% | – | – | 0,5% | Base | Base |
| 27 | 1/4 | 0,6% | – | – | 1,0% | Base | Base |
| 28 | 1/4 | 0,6% | 3/8 | 1,9% | 1,5% | Certifiée | Certifiée |
| 29 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 0,5% | Base | Base |
| 30 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 1,0% | Base | Base |
| 31 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 1,0% | Base | Base |
| 32 | 2/4 | 1,4% | 3/8 | 1,9% | 1,5% | Certifiée | Certifiée |
| 33 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 1,0% | Base | Base |
| 34 | 3/4 | 2,7% | – | – | 4,0% | Certifiée | Certifiée |
| 35 | 3/4 | 2,7% | – | – | 2,5% | Certifiée | Certifiée |
| 36 | 3/4 | 2,7% | – | – | 3,0% | Certifiée | Certifiée |
| 37 | 3/4 | 2,7% | 5/8 | 3,9% | 5,0% | Certifiée | Certifiée |
| 38 | 3/4 | 2,7% | 7/8 | 8,0% | 6,0% | Certifiée | Certifiée |
| 39 | 4/4 | > 2,7% | 4/8 | 2,7% | 2,0% | Certifiée | Certifiée |
| 40 | 4/4 | > 2,7% | 6/8 | 5,4% | 7,5% | Certifiée | Certifiée |
| 41 | 4/4 | > 2,7% | 7/8 | 8,0% | 8,0% | Certifiée | Certifiée |
| 42 | 1/4 | 0,6% | – | – | 1,5% | Base | Certifiée |
| 43 | 1/4 | 0,6% | – | – | 1,5% | Base | Certifiée |
| 44 | 2/8 | 1,1% | – | – | 2,0% | Base | Certifiée |
| 45 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 2,0% | Base | Certifiée |
| 46 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 1,5% | Base | Certifiée |
| 47 | 2/4 | 1,4% | 2/8 | 1,1% | 1,5% | Base | Certifiée |

Tableau 4 | Virus identifiés par séquençage profond

| Identifiant du virus | % de couverture | Nbre de lots concernés | Nbre d'extraits | % d'extraits infectés | Annotations sur la base de données NCBI |
|----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------------|--|
| NC_007289.1 | 99,9% | 8 | 16 | 4,3% | <i>Potato virus S, complete genome</i> |
| NC_001747.1 | 99,8% | 10 | 14 | 3,7% | <i>Potato leafroll virus, complete genome</i> |
| JNC_011620.1 | 99,6% | 1 | 2 | 0,5% | <i>Potato virus X, complete genome</i> |
| NC_001616.1 | 99,5% | 57 | 131 | 34,8% | <i>Potato virus Y, complete genome</i> |
| NC_003725.1 | 96,5% | 5 | 10 | 2,7% | <i>Potato mop-top virus RNA 2, complete sequence</i> |
| NC_003723.1 | 48,1% | 5 | 10 | 2,7% | <i>Potato mop-top virus RNA 1, complete sequence</i> |
| JNC_003724.1 | 40,3% | 5 | 10 | 2,7% | <i>Potato mop-top virus RNA 3, complete sequence</i> |

contrôle cultural des lots, réalisé la saison suivante, permet un contrôle *a posteriori* des analyses de laboratoire, sur la base des symptômes visibles dans les parcelles. Ce contrôle présente néanmoins certaines limites, notamment pour les viroses asymptomatiques sur feuillage.

Le séquençage profond sur plateforme Illumina procure un meilleur contrôle de la qualité des analyses de routine du laboratoire. Il permet de vérifier dès la fin de la campagne d'analyses l'adéquation entre les amorces utilisées et les souches virales présentes dans les extraits. Il s'affranchit également de la nécessité de pouvoir observer des symptômes visibles et contrôle la présence de tous les virus connus.

Dans le cas du PVY, les amorces utilisées amplifient la zone située entre les positions 8878 et 8950 du génome du PVY. Lors du contrôle de l'analyse des 94 lots présentés dans ce travail, 28178 séquences Illumina ont pu être cartographiées sur cette zone. Une seule substitution d'une guanine par une alanine dans 12% des séquences cartographiées a été détectée en position 16 de la séquence de l'amorce Fw (tabl. 5). Ce type de modification n'affecte pas la détection du virus dans nos conditions d'analyses. Un contrôle identique a également confirmé la bonne adéquation des amorces du PLRV avec les séquences Illumina cartographiées sur le génome du PLRV. Le séquençage profond réalisé sur un assemblage unique d'extraits issu des 94 lots analysés garantit la bonne correspondance des amorces utilisées avec les souches présentes dans ces lots.

Conclusions

Les résultats obtenus sur un grand nombre de variétés différentes et infectées en conditions naturelles montrent une bonne cohérence entre les résultats ELISA sur des tubercules analysés individuellement et les résultats de la *real time* RT-PCR obtenus sur des échantillons regroupés.

La *real time* RT-PCR permet d'obtenir des résultats sur tubercules dormants, sans avoir recours au préalable à des traitements chimiques toxiques et polluants ou à base d'hormones végétales. Les délais sont raccourcis et la sécurité augmentée, tout en maintenant les coûts à un niveau équivalent à ceux de l'ELISA.

L'extraction d'ARN de haute qualité utilisée dans cette méthode analytique permet de dépister des viroses rares sur des échantillons regroupés, ainsi qu'un contrôle de la qualité des analyses grâce au séquençage profond sur plateforme Illumina. Les extraits d'ARN conservés à -80°C peuvent être ré-analysés ultérieurement en cas de défaut de qualité constaté lors du contrôle. Cette approche novatrice sans *a priori* permet de détecter virtuellement tous les virus connus, ainsi que les souches mutantes ou recombinantes. Elle garantit à la Suisse un haut niveau de contrôle de la qualité sanitaire du plant de pomme de terre. ■

Tableau 5 | Analyse de correspondance entre la séquence des amorces et sondes utilisées avec les séquences identifiées et cartographiées sur la zone d'amplification. Le tableau indique la nature de la base sur chaque position de la zone cible sur le génome de référence (col. 1 et 2). Les zones correspondant aux deux amorces Fw et Rev et à la sonde sont indiquées dans la colonne 3. Chacune des 28178 séquences Illumina cartographiée sur la zone peut comporter l'une des 4 bases possibles (col. 6 à 9) ou ne pas couvrir la position (col. 5). Le tableau indique le pourcentage de séquences qui comportent chacune de ces 5 possibilités, à chaque position. Seule la position 16 de l'amorce Fw (surlignée en jaune) est porteuse de polymorphisme. La présence d'une alanine à la place d'une guanine en position 16 de l'amorce Fw (12% des séquences) n'empêche pas un appariement correct de l'amorce lors de la PCR. Les séquences polymorphiques sur cette position sont donc aussi détectées par real time RT-PCR dans nos conditions d'analyse.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
|--------------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----|-----|-----|------|--------------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| Position sur le génome de réf. | Séquence de référence | | Position sur l'amorce | Position non couverte | A | C | G | T | Position sur le génome de réf. | Séquence de référence | | Position sur l'amorce | Position non couverte | A | C | G | T | |
| 8878 | C | Amorce Fw | 1 | 19% | 0% | 81% | 0% | 0% | 8915 | C | Sonde | 12 | 48% | 0% | 51% | 0% | 0% | |
| 8879 | A | | 2 | 19% | 81% | 0% | 0% | 0% | 8916 | T | | 13 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 47% |
| 8880 | T | | 3 | 19% | 0% | 0% | 0% | 81% | 8917 | T | | 14 | 53% | 0% | 0% | 0% | 0% | 47% |
| 8881 | A | | 4 | 19% | 81% | 0% | 0% | 0% | 8918 | A | | 15 | 52% | 47% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 8882 | G | | 5 | 19% | 0% | 0% | 81% | 0% | 8919 | T | | 16 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% |
| 8883 | G | | 6 | 23% | 0% | 0% | 77% | 0% | 8920 | G | | 17 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% |
| 8884 | A | | 7 | 27% | 73% | 0% | 0% | 0% | 8921 | G | | 18 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% |
| 8885 | G | | 8 | 27% | 0% | 0% | 73% | 0% | 8922 | T | | 19 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% |
| 8886 | A | | 9 | 36% | 64% | 0% | 0% | 0% | 8923 | T | | 20 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% |
| 8887 | A | | 10 | 36% | 64% | 0% | 0% | 0% | 8924 | T | | 21 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% |
| 8888 | A | | 11 | 36% | 64% | 0% | 0% | 0% | 8925 | G | | 22 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% |
| 8889 | C | | 12 | 35% | 0% | 65% | 0% | 0% | 8926 | G | | 23 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% |
| 8890 | T | | 13 | 35% | 0% | 0% | 0% | 65% | 8927 | T | | 24 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% |
| 8891 | G | | 14 | 34% | 0% | 0% | 66% | 0% | 8928 | G | | 25 | 53% | 0% | 0% | 47% | 0% | 0% |
| 8892 | A | | 15 | 34% | 66% | 0% | 0% | 0% | 8929 | C | | 26 | 52% | 0% | 47% | 0% | 0% | 0% |
| 8893 | G | 16 | 34% | 12% | 0% | 53% | 0% | 8930 | A | 27 | 52% | 47% | 0% | 0% | 0% | 0% | | |
| 8894 | A | 17 | 35% | 65% | 0% | 0% | 0% | 8931 | | | 53% | 0% | 0% | 0% | 0% | 47% | | |
| 8895 | T | 18 | 35% | 0% | 0% | 0% | 65% | 8932 | T | 1 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 48% | | |
| 8896 | G | 19 | 33% | 0% | 0% | 67% | 0% | 8933 | G | 2 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% | | |
| 8897 | C | 20 | 33% | 0% | 67% | 0% | 0% | 8934 | A | 3 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | 0% | | |
| 8898 | C | 21 | 31% | 0% | 69% | 0% | 0% | 8935 | A | 4 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | 0% | | |
| 8899 | A | 22 | 34% | 66% | 0% | 0% | 0% | 8936 | A | 5 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | 0% | | |
| 8900 | A | 23 | 36% | 64% | 0% | 0% | 0% | 8937 | A | 6 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | 0% | | |
| 8901 | C | 24 | 36% | 0% | 64% | 0% | 0% | 8938 | T | 7 | 51% | 0% | 0% | 0% | 0% | 49% | | |
| 8902 | T | 25 | 36% | 0% | 0% | 0% | 64% | 8939 | G | 8 | 51% | 0% | 0% | 49% | 0% | 0% | | |
| 8903 | G | | 35% | 0% | 0% | 65% | 0% | 8940 | G | 9 | 51% | 0% | 0% | 49% | 0% | 0% | | |
| 8904 | T | Sonde | 1 | 35% | 0% | 0% | 0% | 65% | 8941 | A | Amorce Rev | 10 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | |
| 8905 | G | | 2 | 35% | 0% | 0% | 65% | 0% | 8942 | A | | 11 | 52% | 48% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 8906 | A | | 3 | 35% | 65% | 0% | 0% | 0% | 8943 | C | | 12 | 52% | 0% | 48% | 0% | 0% | 0% |
| 8907 | T | | 4 | 35% | 0% | 0% | 0% | 65% | 8944 | C | | 13 | 52% | 0% | 48% | 0% | 0% | 0% |
| 8908 | G | | 5 | 38% | 0% | 0% | 62% | 0% | 8945 | T | | 14 | 52% | 0% | 0% | 0% | 0% | 47% |
| 8909 | A | | 6 | 39% | 61% | 0% | 0% | 0% | 8946 | C | | 15 | 52% | 0% | 48% | 0% | 0% | 0% |
| 8910 | A | | 7 | 38% | 62% | 0% | 0% | 0% | 8947 | G | | 16 | 52% | 0% | 0% | 48% | 0% | 0% |
| 8911 | T | | 8 | 38% | 0% | 0% | 0% | 62% | 8948 | C | | 17 | 53% | 0% | 47% | 0% | 0% | 0% |
| 8912 | G | | 9 | 41% | 0% | 0% | 59% | 0% | 8949 | C | | 18 | 53% | 0% | 47% | 0% | 0% | 0% |
| 8913 | G | | 10 | 43% | 0% | 0% | 57% | 0% | 8950 | A | | 19 | 53% | 46% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 8914 | G | | 11 | 44% | 0% | 0% | 56% | 0% | | | | | | | | | | |

Riassunto**Diagnosi molecolare ad alto rendimento per individuare le virosi delle piante di patate**

Ai fini della certificazione delle piante di patate destinate ai produttori svizzeri, ogni anno Agroscope controlla quasi 300 000 tuberi per accertare che siano esenti da virus. Dal 2016 questo controllo è effettuato su tuberi dormienti immediatamente dopo la raccolta, impiegando il metodo della PCR quantitativa o PCR *real time*. Questo progresso permette di ottenere più rapidamente dei risultati e rende superflui i trattamenti chimici tossici e inquinanti utilizzati per far uscire i tuberi dalla dormienza.

La nuova catena analitica sviluppata da Agroscope è stata convalidata su decine di lotti e quasi 15 000 tuberi per un periodo di 3 anni. Questa procedura permette di controllare che ogni fase dell'analisi sia realizzata correttamente e si presta facilmente anche a identificare altri tipi di microrganismi che possono compromettere la qualità delle piante di patate.

Summary**High-throughput molecular diagnostics for detecting potato-plant viruses**

Every year, Agroscope inspects almost 300 000 tubers for the presence or absence of viruses in order to certify potato plants destined for Swiss producers. From 2016 onwards, this inspection has been performed using real time polymerase chain reaction (RT-PCR) on dormant tubers right after the harvest. The new method allows results to be obtained more quickly, and dispenses with the use of toxic and polluting chemical treatments for breaking dormancy.

The new analytical chain was developed by Agroscope, and validated over a period of three years on dozens of lots and almost 15,000 tubers.

Offering the means to check that each stage of the analysis has been performed correctly, it can easily be adapted to screen for other types of microorganisms likely to affect the quality of the potato plants.

Key words: potato viruses, certification, molecular diagnostic, real time RT-PCR, next generation sequencing.

Bibliographie

- Agindotan B. O., Shiel P. J. & Berger P. H., 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan(R) real time RT-PCR. *Journal of virological methods* **142**, 1–9.
- Basky Z., 2002. The relationship between aphid dynamics and two prominent potato viruses (PVY and PLRV) in seed potatoes in Hungary. *Crop Protection* **21** (9), 823–827.
- Gugerli P. & Gehriger W., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Research* **23**, 353–359.
- Keller E. R. & Bérces S., 1966. Check-Testing for virusy and leaf-rollin seed potatoes with particular reference to methods of increasing precision with the A6-leaf test for virus Y. *European Potato Journal* **9**, 1–14.
- Kogovsek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G. D., Boonham N. & Ravnkar A., 2008. Single-step RT real time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *Journal of virological methods* **149**, 1–11.
- Perring T. M., Gruenhagen N. M. & Farrar C. A., 1999. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 457–481.
- Roenhorst J. W., Jansen C. C. C., Kox L. F. F., de Haan E. G., van den Bovenkamp G. W., Boonham N., Fisher T. & Mumford R. A., 2005. Application of real time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiroviroid. *EPPO Bulletin* **35**, 133–140.
- Steinger T., Gilliland H. & Hebeisen T., 2014. Epidemiological analysis of risk factors for the spread of potato viruses in Switzerland. *Ann. Appl. Biol.* **164**, 200–207.
- Valkonen J. P. T., 2007. Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil D. (ed), *Potato Biology and Biotechnology*. New York, NY, USA, Elsevier, 619–641.
- Verbeek M., Piron P. G. M., Dullemans A. M., Cuperus, C. & van der Vlugt R. A. A., 2010. Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of Potato virus Y. In: *Ann. Appl. Biol.*, 39–49.