

Détection, suivi et quantification de la résistance

contact-r4p@inra.fr

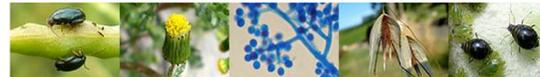
www.inra-r4p.fr

 @R4P_network

Christophe PLANTAMP

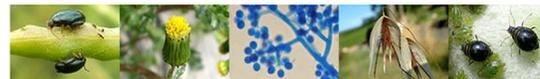
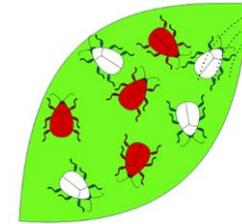
Myriam SIEGWART

christophe.plantamp@anses.fr



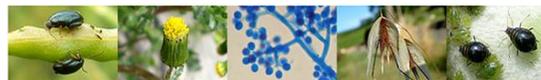
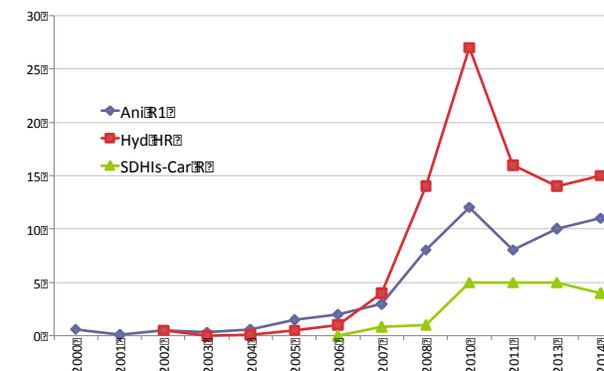
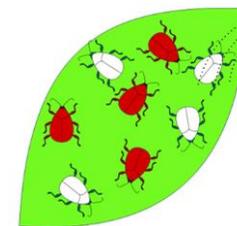
Pourquoi suivre la résistance aux PPP ?

- Gestion des résistances: durabilité de l'usage des PPP
- Ce que nous cherchons :
 - Individus d'une population résistants à un PPP au delà du seuil (X fois supérieur à la ligne de base)
 - Des profils de résistance croisée
 - Résistance quantitative
 - Résistances multiples
 - Fréquences de résistance(s) dans une population



Pourquoi suivre la résistance aux PPP ?

- Gestion des résistances: durabilité de l'usage des PPP
- Ce que nous cherchons :
 - Individus d'une population résistants à un PPP au delà du seuil (X fois supérieur à la ligne de base)
 - Des profils de résistance croisée
 - Résistance quantitative
 - Résistances multiples
 - Fréquences de résistance(s) dans une population

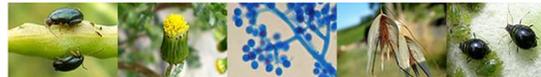


Pourquoi suivre la résistance aux PPP ?

- Gestion des résistances: durabilité de l'usage des PPP
- Ce que nous cherchons :

Détection

- Individus d'une population résistants à un PPP au delà du seuil (X fois supérieur à la ligne de base)
 - Des profils de résistance croisée
 - Résistance quantitative
 - Résistances multiples
- Fréquences de résistance(s) dans une population



Pourquoi suivre la résistance aux PPP ?

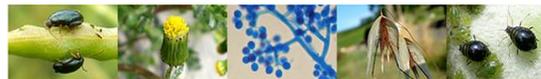
- Gestion des résistances: durabilité de l'usage des PPP
- Ce que nous cherchons :

Détection

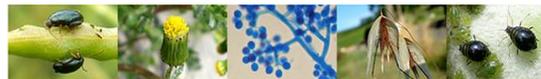
- Individus d'une population résistants à un PPP au delà du seuil (X fois supérieur à la ligne de base)
- Des profils de résistance croisée

Quantification

- Résistance quantitative
- Résistances multiples
- Fréquences de résistance(s) dans une population



Critères de choix des tests

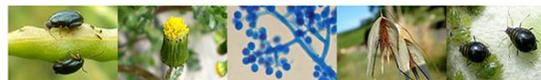


Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

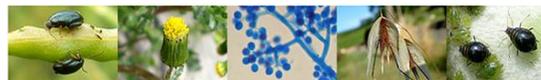
NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

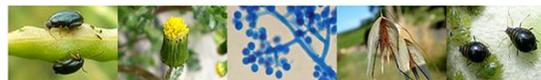
❖ Temps & argent (temps = argent)

\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)

❖ Qui fait l'analyse?

- cultivateur
- technicien du champ
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

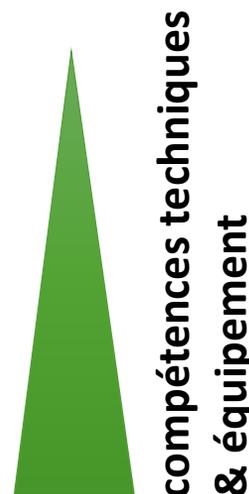
NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

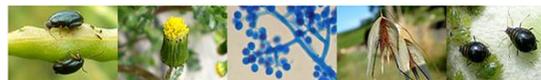
\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)



❖ Qui fait l'analyse?

- cultivateur
- technicien du champ
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche



Revue sur les méthodes de détection des résistances

Trends in Plant Science

CellPress

Feature Review

Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection

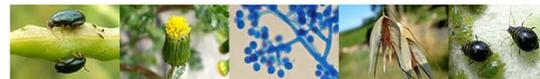
R4P Network^{1,‡,*}

↑Correspondence:

contact-r4p@listes.inra.fr .

‡R4P Network members and affiliations: Benoit Barrès, Annie Micoud (Unité RPP, ANSES, Lyon, France), Marie-France Corio-Costet (UMR SAVE, INRA, Villenave d'Omon, France), Danièle Debieu, Sabine Fillinger, [®]twitter: [@INRA_BIOGER](https://twitter.com/INRA_BIOGER)*, Anne-Sophie Walker (UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, France),

Trends in Plant Science, October 2016, Vol. 21, No. 10 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>

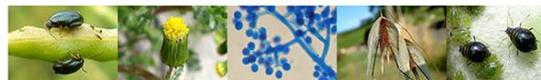


Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

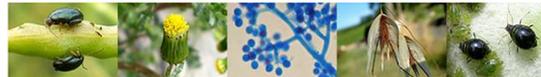
NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

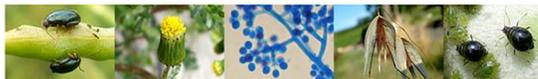
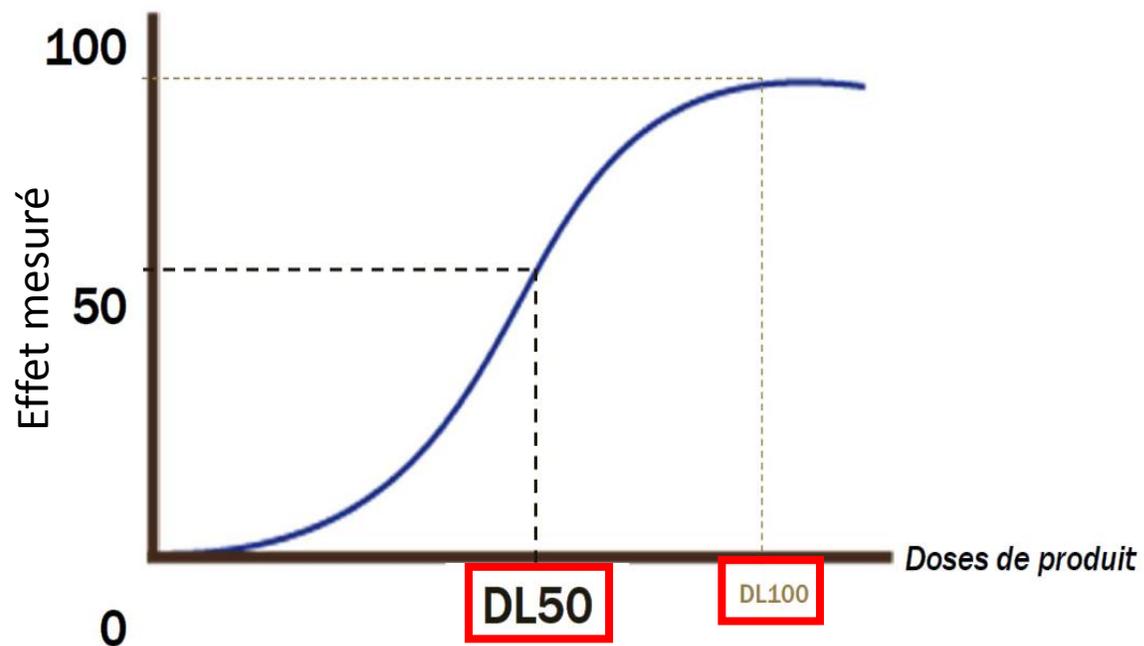


01_Tests biologiques

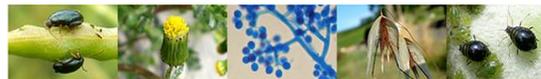
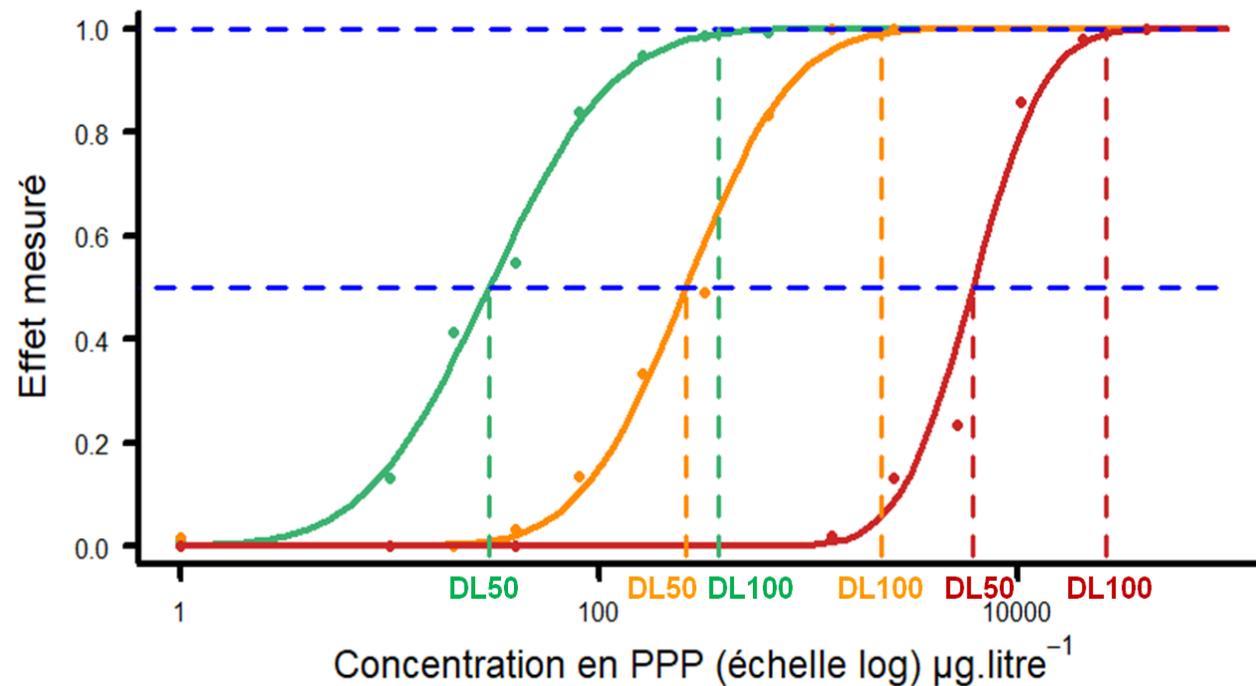
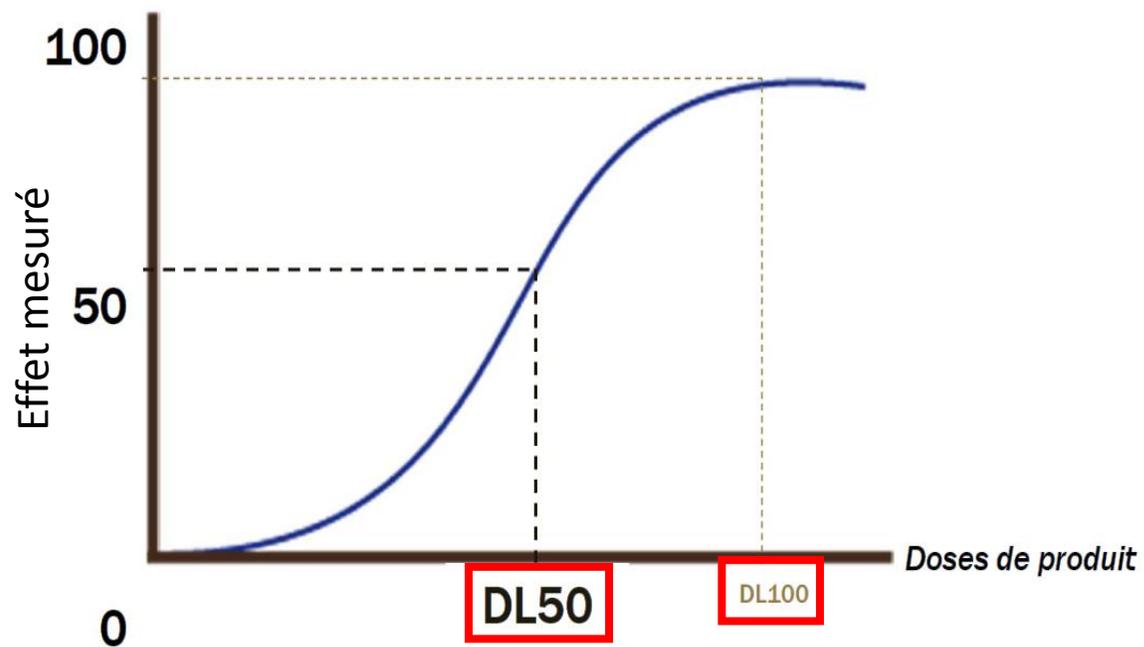
- fongicides
- insecticides
- herbicides



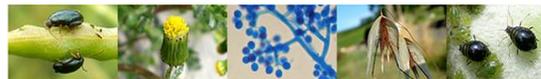
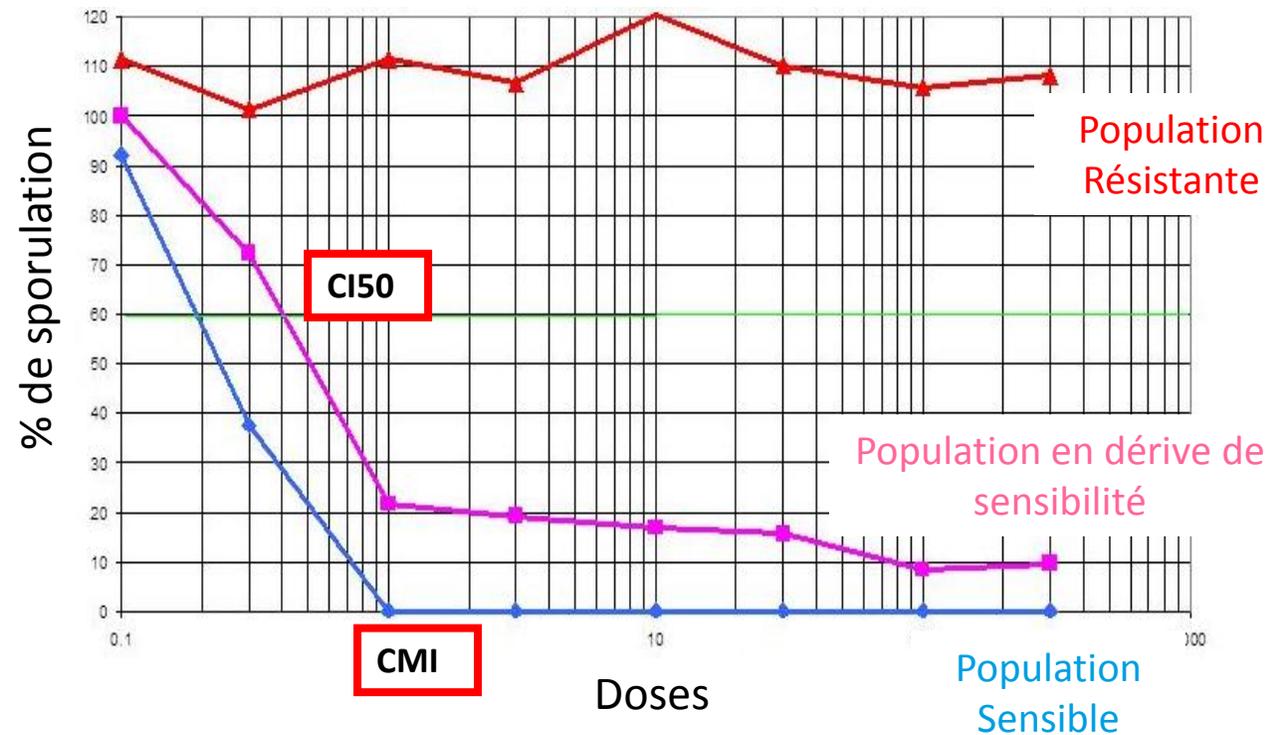
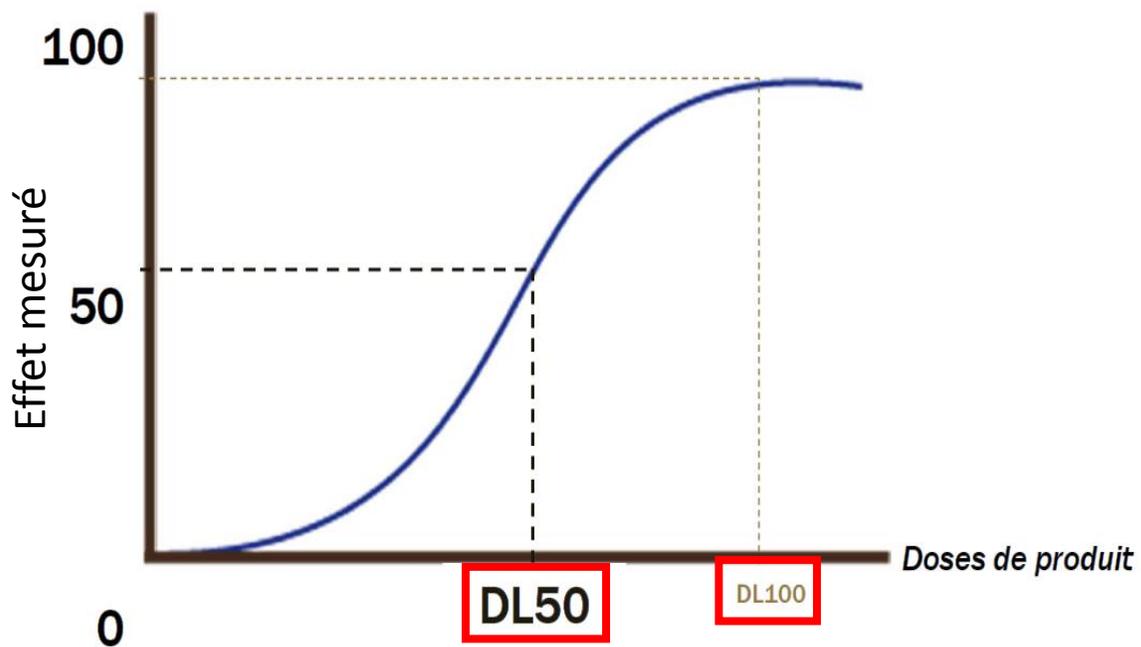
Tests biologiques: courbe dose-réponse



Tests biologiques: courbe dose-réponse

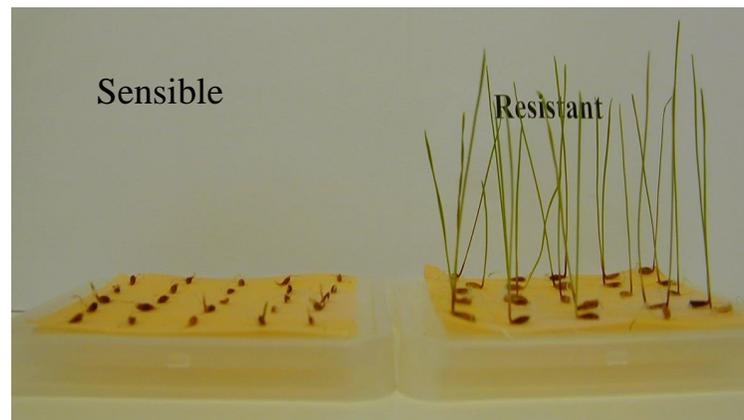
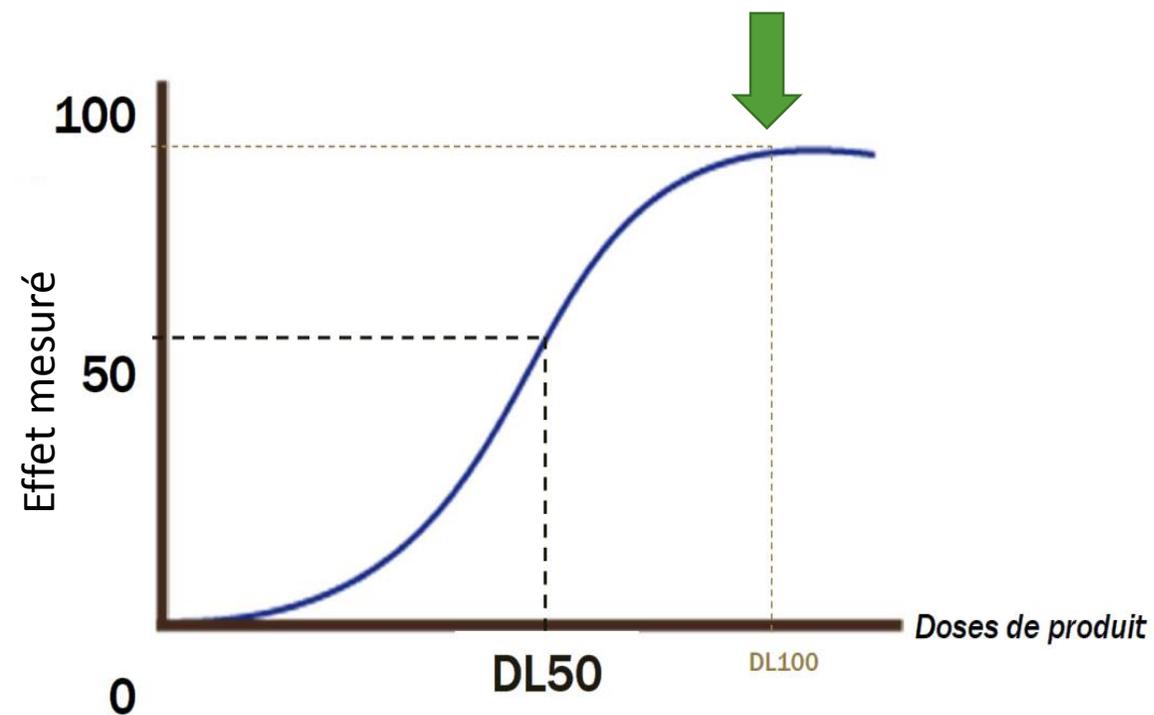


Tests biologiques: courbe dose-réponse



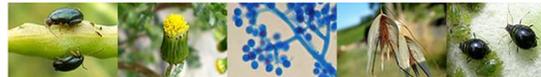
Tests biologiques: dose discriminante

- DL100 de la référence sensible
- Dose au champ



01_Tests biologiques

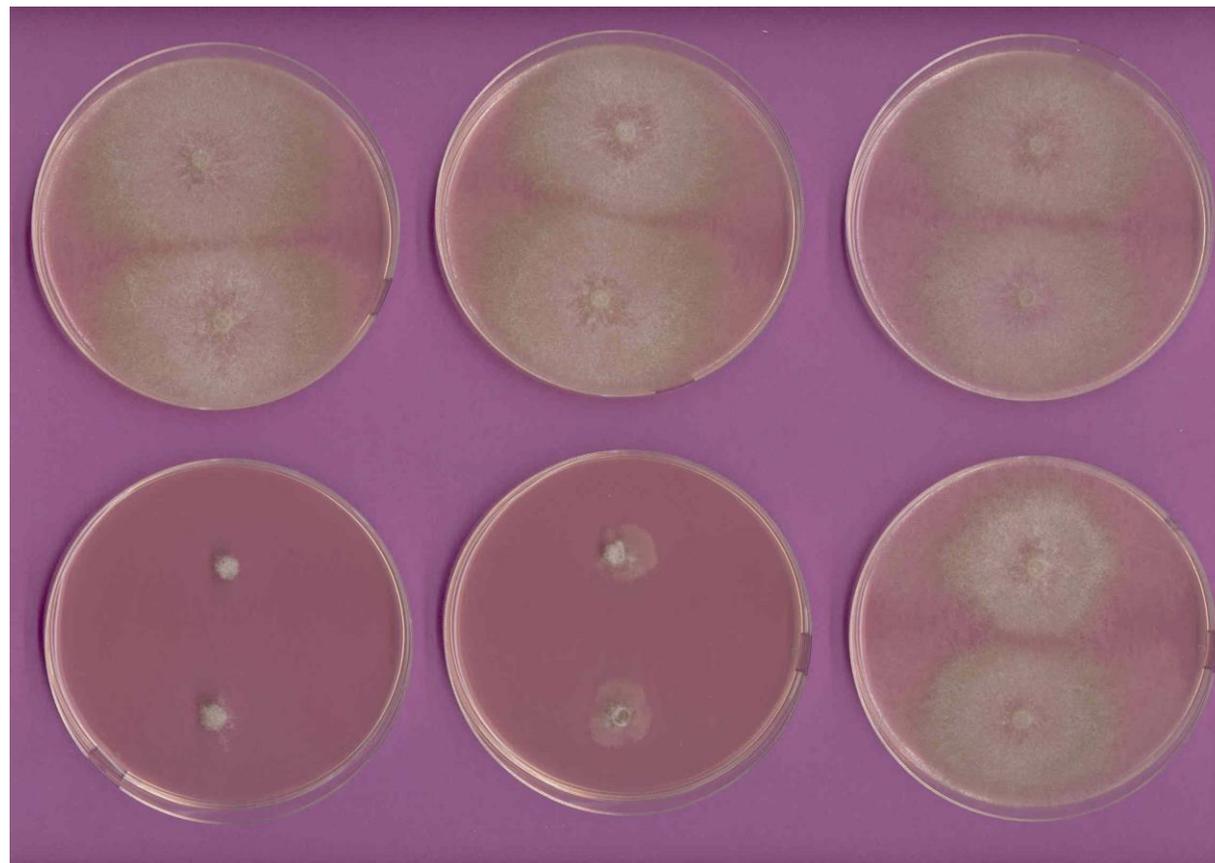
- fongicides
- insecticides
- herbicides



Mesure de croissance mycélienne

Contrôle

Fongicide
x ppm



Susceptible

Susceptible

Résistant

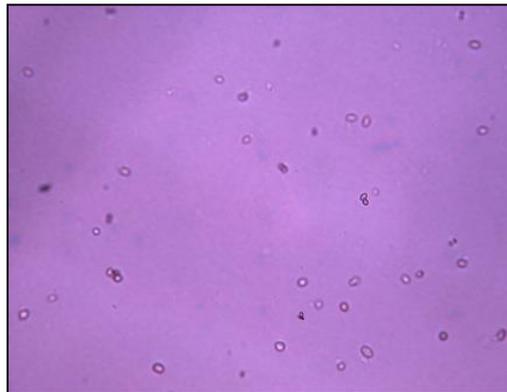


Mesure de germination des spores sur individus ou mélanges

Contrôle

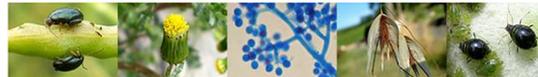


Fongicide
x ppm



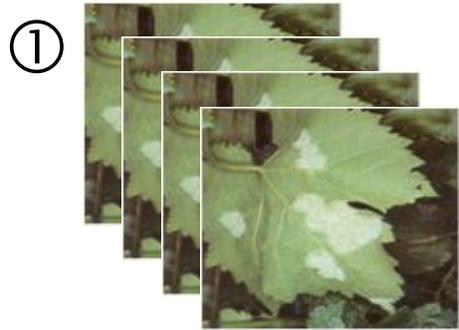
Sensible

Resistant

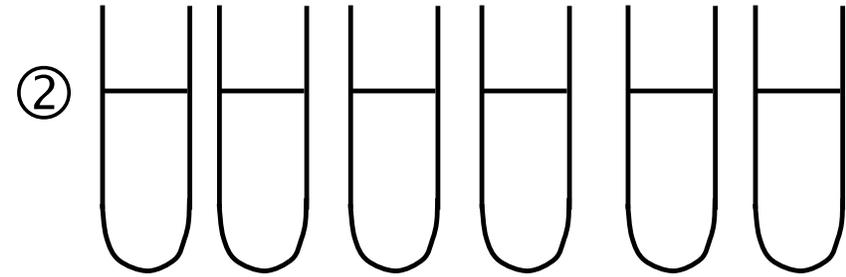


Mesure de niveau de sporulation

Exemple: la résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*)



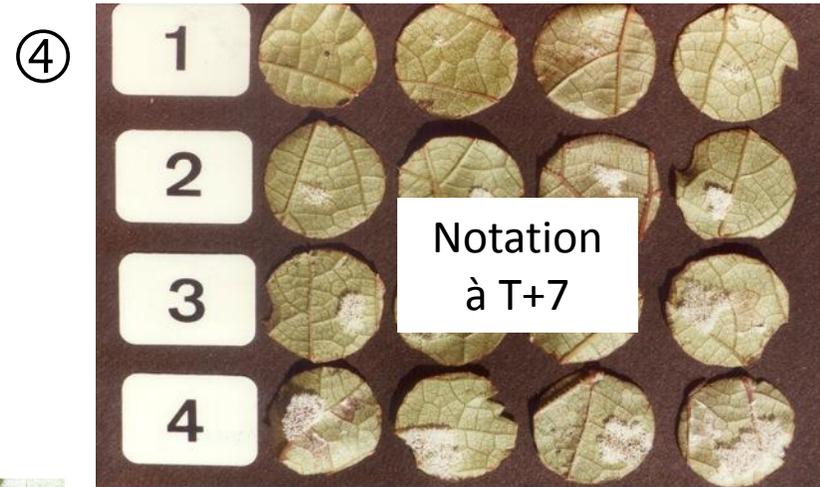
Lavage des feuilles, nouvelle sporulation, repiquage et suspension



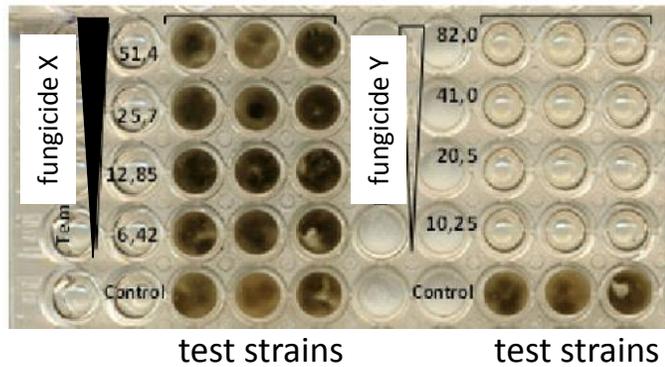
0 – 0.01 – 0.1 – 1 – 10 – 100 mg/L
Gamme de dose de fongicides +
suspension (V/V)



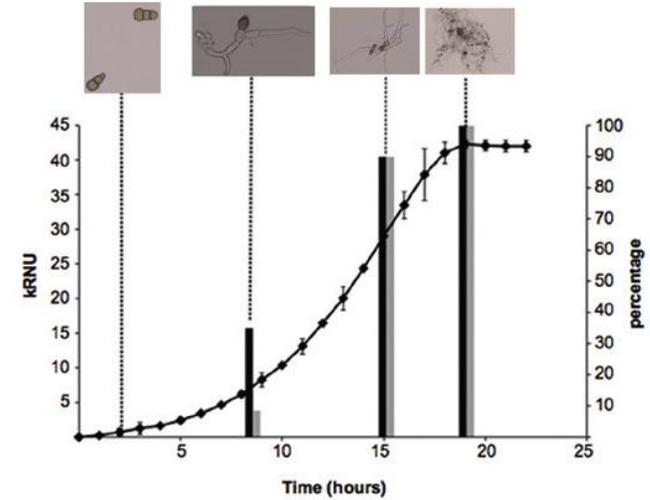
Dépôt de gouttes sur disques de feuilles



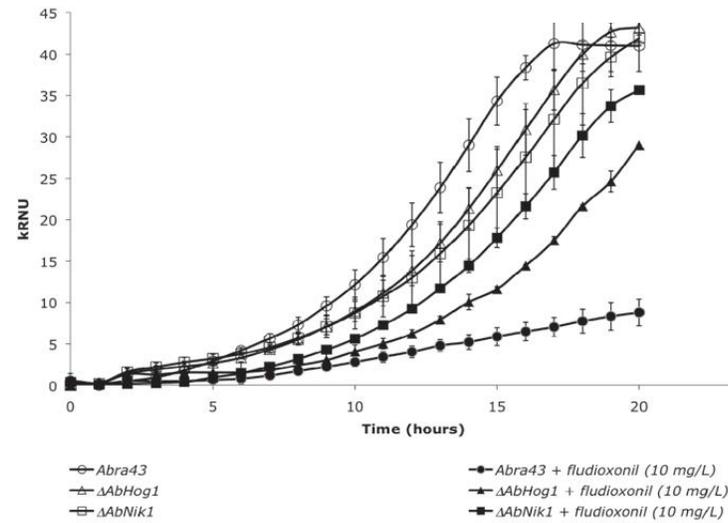
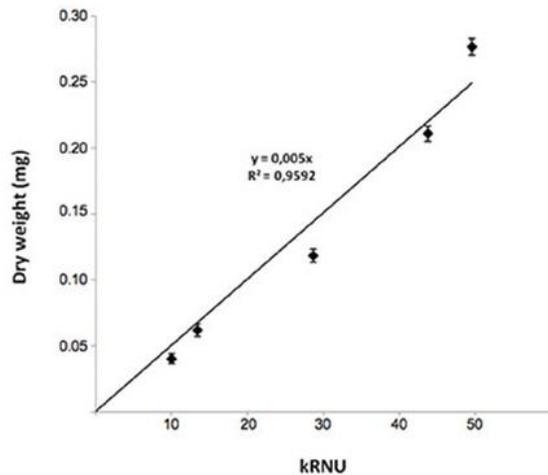
Mesure de croissance semi-automatiques



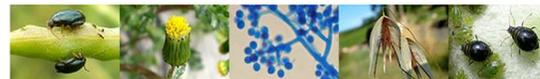
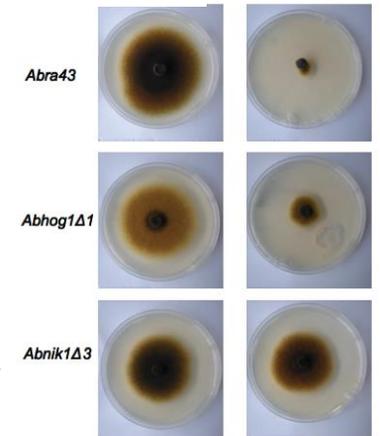
Mesure de densité
optique
(nephelometer)



Mesure de masse sèche



PDA + Fludioxonil (10 mg/L)



Analyse de populations

Collection d'échantillons



Spores ou baies infectées

suspension
de spores



Eau stérile

Inoculation



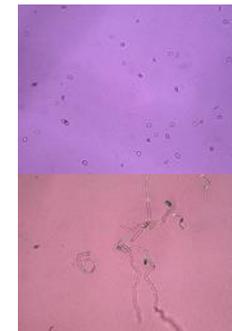
Milieu à doses
discriminante
s

Incubation
18°C



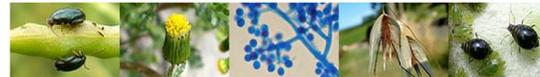
Exemple de *Botrytis
cinerea*

Notation au
microscope



24-48h

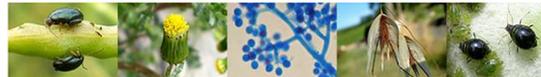
Fréquence des
phénotypes R



COLLOQUE RÉSISTANCE AUX PESTICIDES 14 ET 15 FÉVRIER 2019 À MONTRÉAL

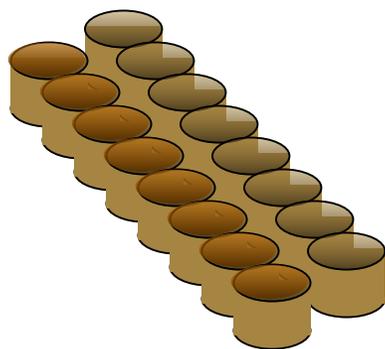
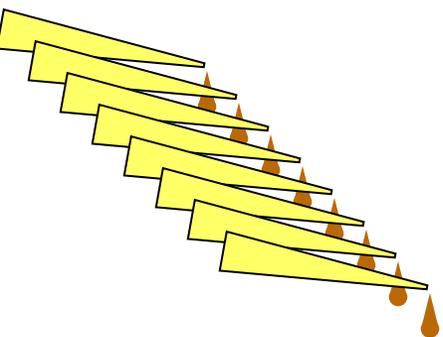
01_Tests biologiques

- fongicides
- insecticides
- herbicides

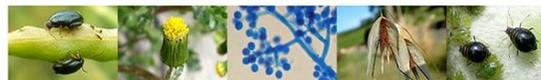


Test de mortalité après exposition insecticide

Exemple sur larves du carpocapse

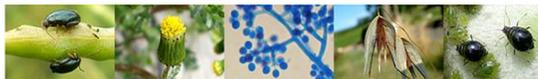
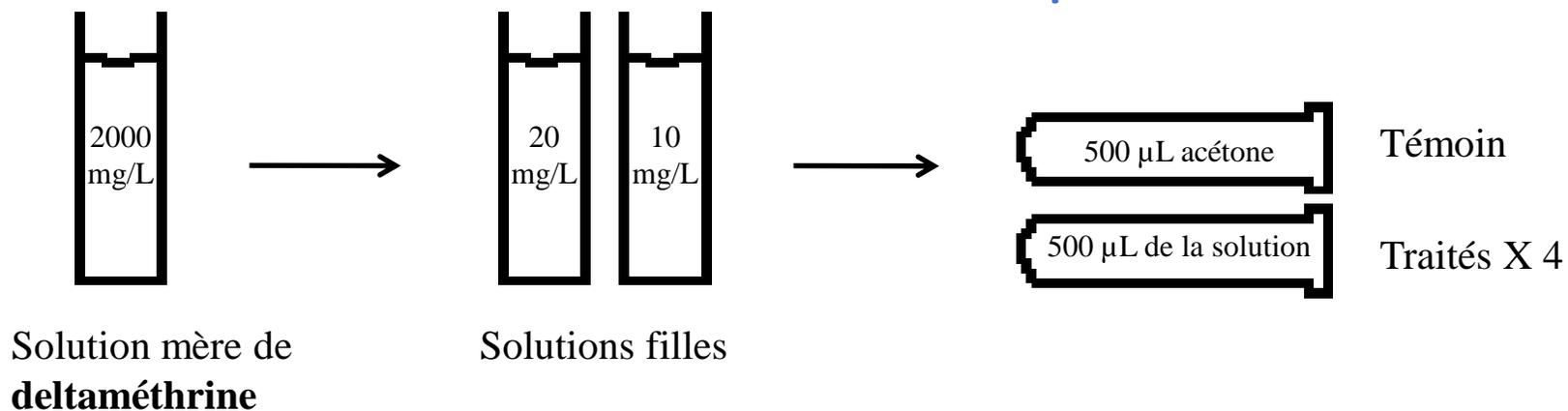


- Microplaques de 96 puits remplies au $\frac{3}{4}$ avec du milieu artificiel (milieu soja *Stonefly*)
- Dépôt de dilutions d'insecticides
- Installation d'une larve néonate par puits
- Lecture de la mortalité après 7 jours



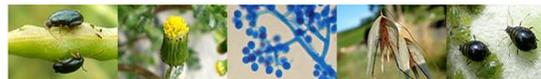
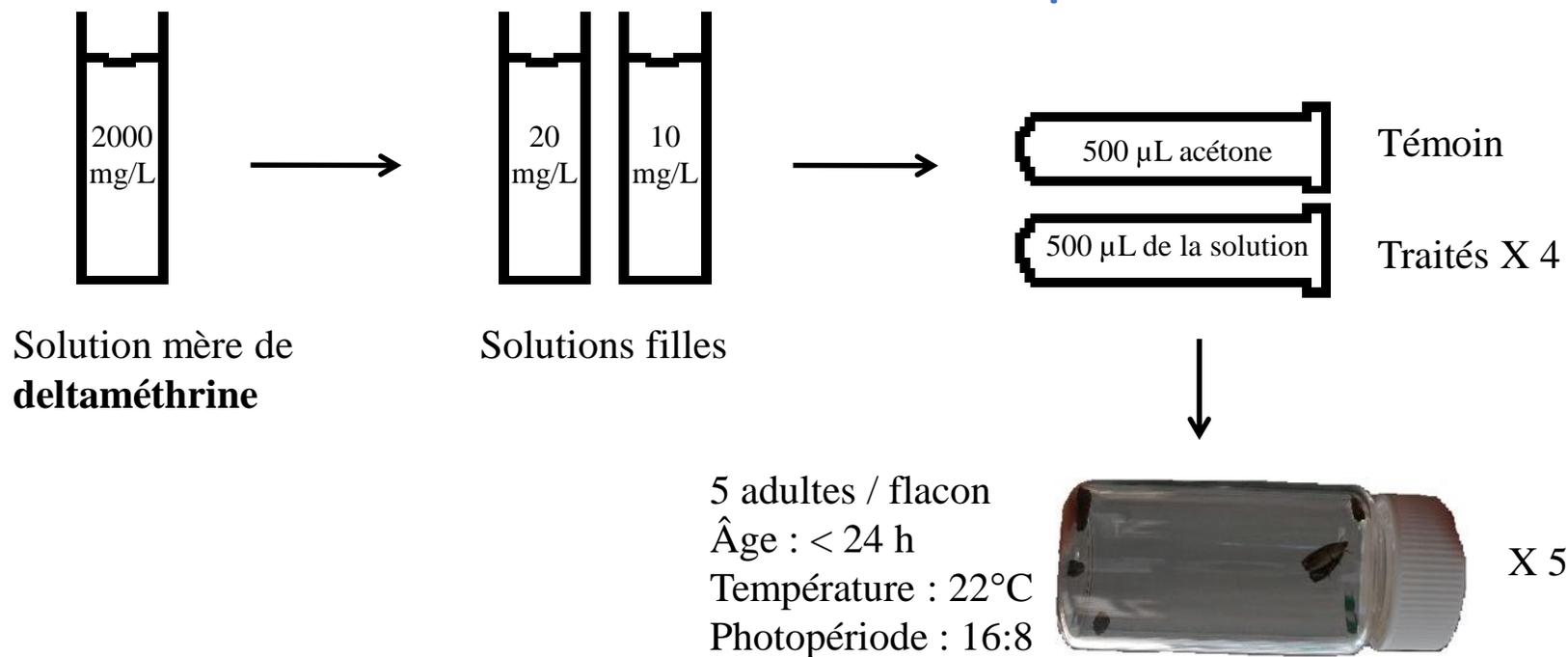
Test de mortalité après exposition insecticide

Exemple sur adultes du carpocapse



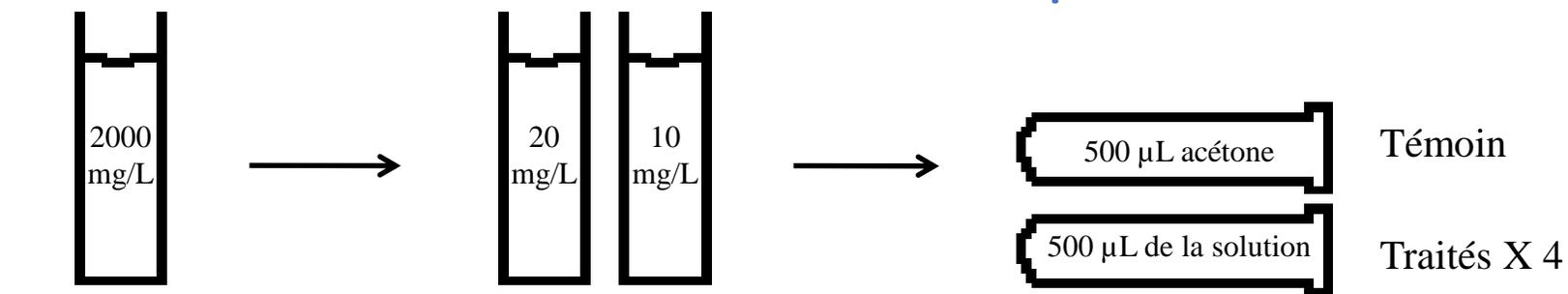
Test de mortalité après exposition insecticide

Exemple sur adultes du carpocapse



Test de mortalité après exposition insecticide

Exemple sur adultes du carpocapse



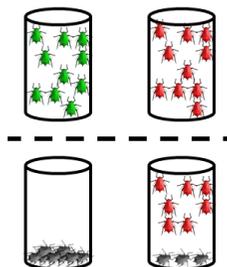
Solution mère de
deltaméthrine

Solutions filles

5 adultes / flacon
Âge : < 24 h
Température : 22°C
Photopériode : 16:8



X 5

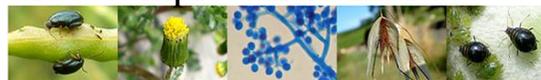


Vivants : adultes se déplacent

Moribonds : pas de déplacements mais mouvements

Morts : adultes complètement morts

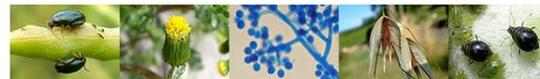
Lecture à
48 heures



Contraintes de test sur insectes vivants

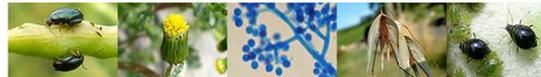
- Si pas d'élevage
 - Besoin de beaucoup de matériel biologique
 - le test doit être souple et facile à mettre en place
- Test de souches du champ après au moins 1 génération en laboratoire afin d'amplifier la population
- Nécessité d'un milieu nutritif d'élevage

Pucerons	<i>Drosophila suzukii</i>	Carpocapse	Cicadelle
1 génération en 1 ou 2 semaines au labo	1 génération en 2 semaines au labo	1 génération en 6 mois au labo	Pas d'élevage
Test directement ou après 1 génération	Test directement ou après 1 génération	Collecte – automne, Accouplement Hibernation – 6 mois Tests - printemps	Temps avant émergence du bois de vigne



01_Tests biologiques

- fongicides
- insecticides
- herbicides



Test de sensibilité aux herbicides



Semences

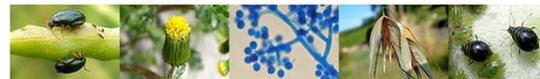
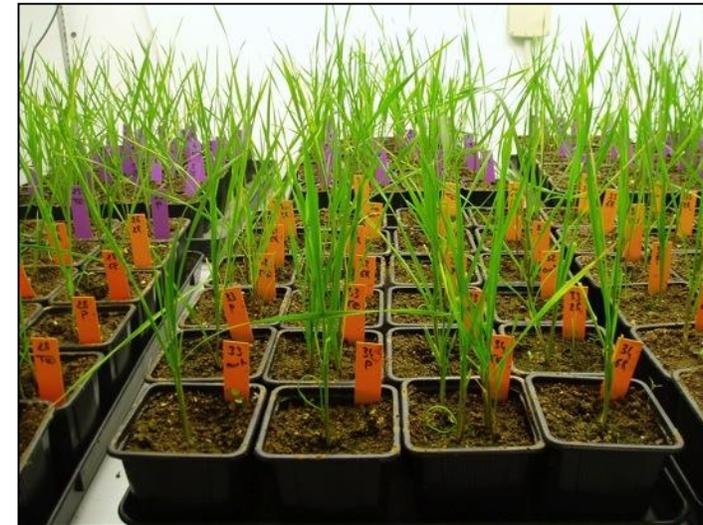
Laisser pousser



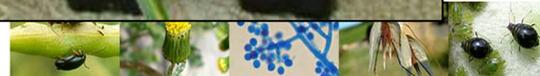
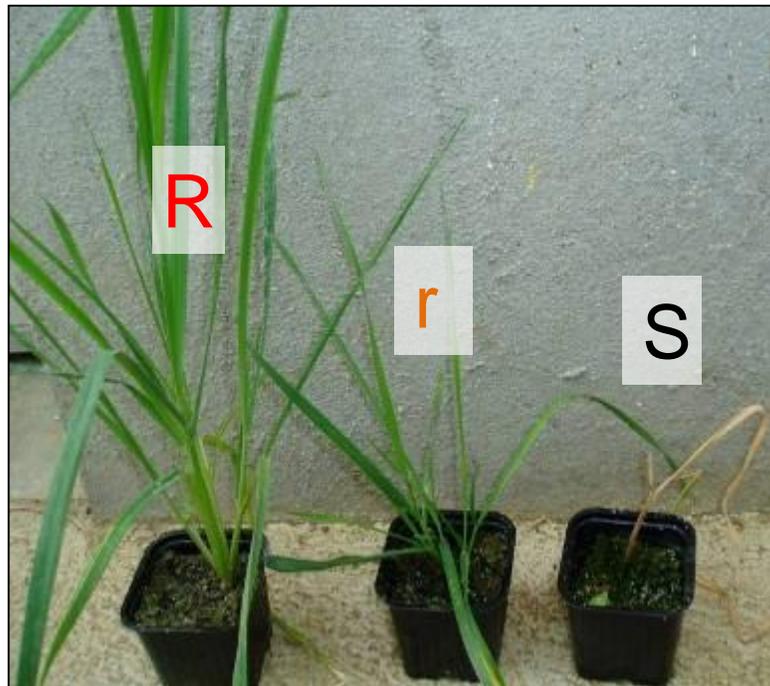
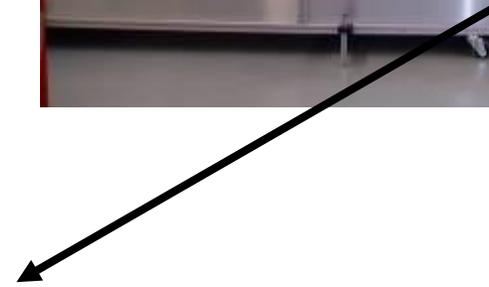
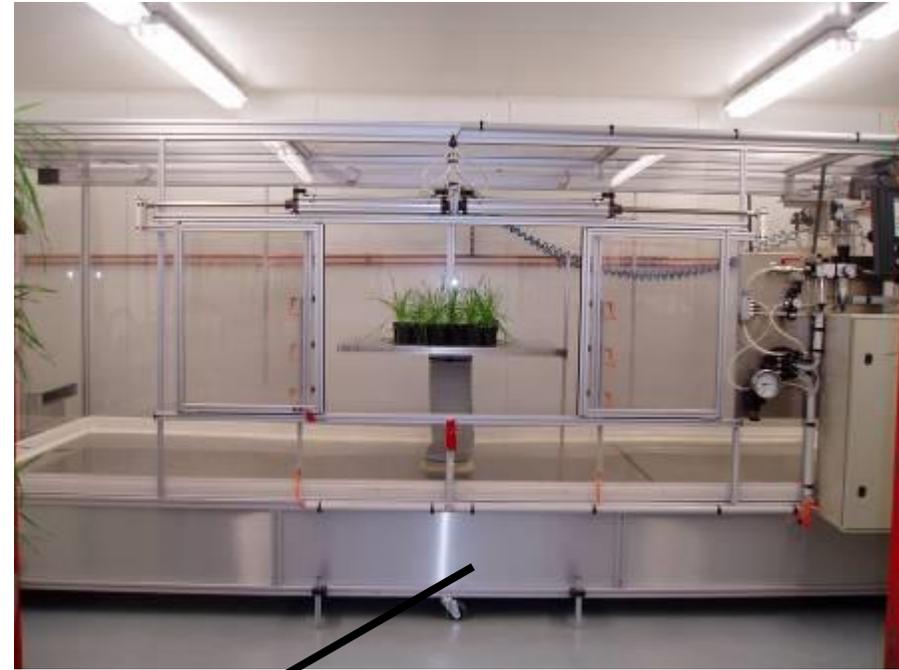
Cloner
(éventuellement)



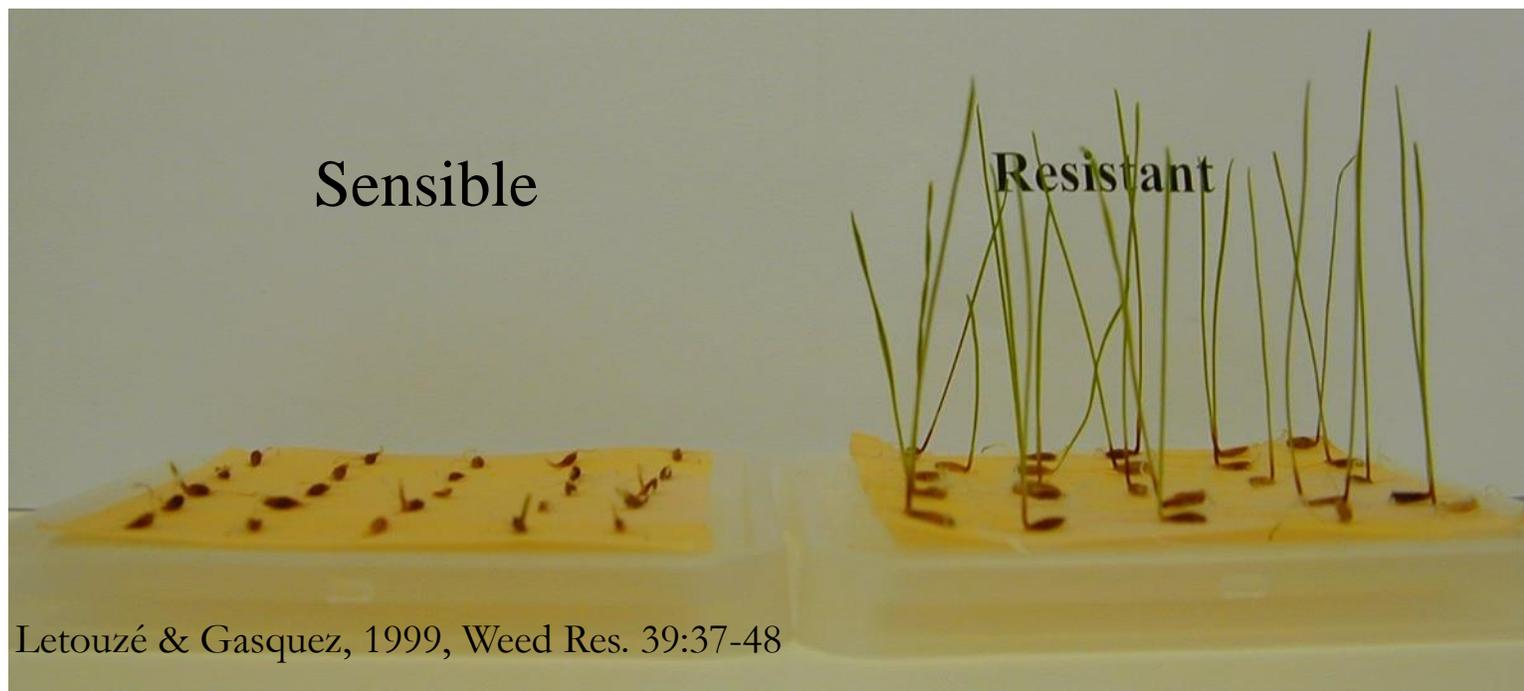
Prélever, préparer,
empoter les plantes



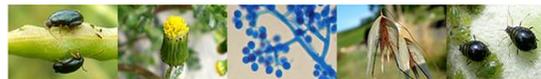
Test de sensibilité aux herbicides



Test biologique « de poche »: le test « semence »



- **Matériel végétal:** graines capables de germer
- **Durée:** 2 semaines à quelques mois
- **Bien adapté** pour herbicides racinaires, moins pour herbicides foliaires



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

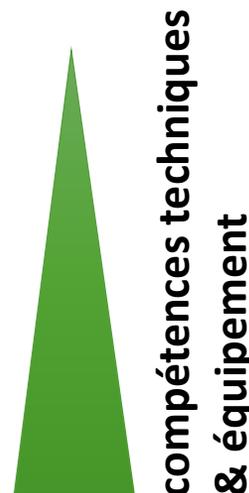
NON : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

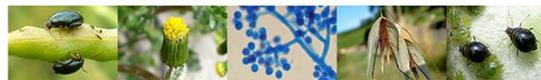
\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)



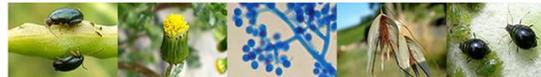
❖ Qui fait l'analyse?

- cultivateur
- technicien du champ
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche



02_Tests biochimiques

- (insectes/adventices)
Connaissance au préalable du mécanisme de résistance



Tests biochimiques: détecter une activité enzymatique de « detox » ou un métabolite



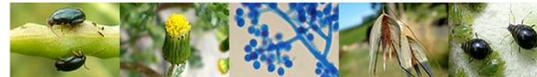
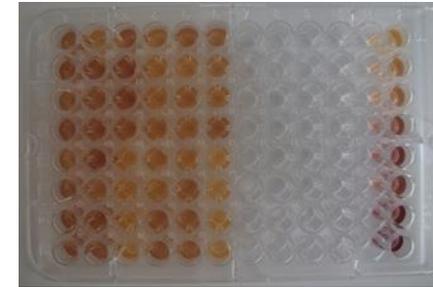
Grande diversité des mécanismes de dégradation



Tests biochimiques:

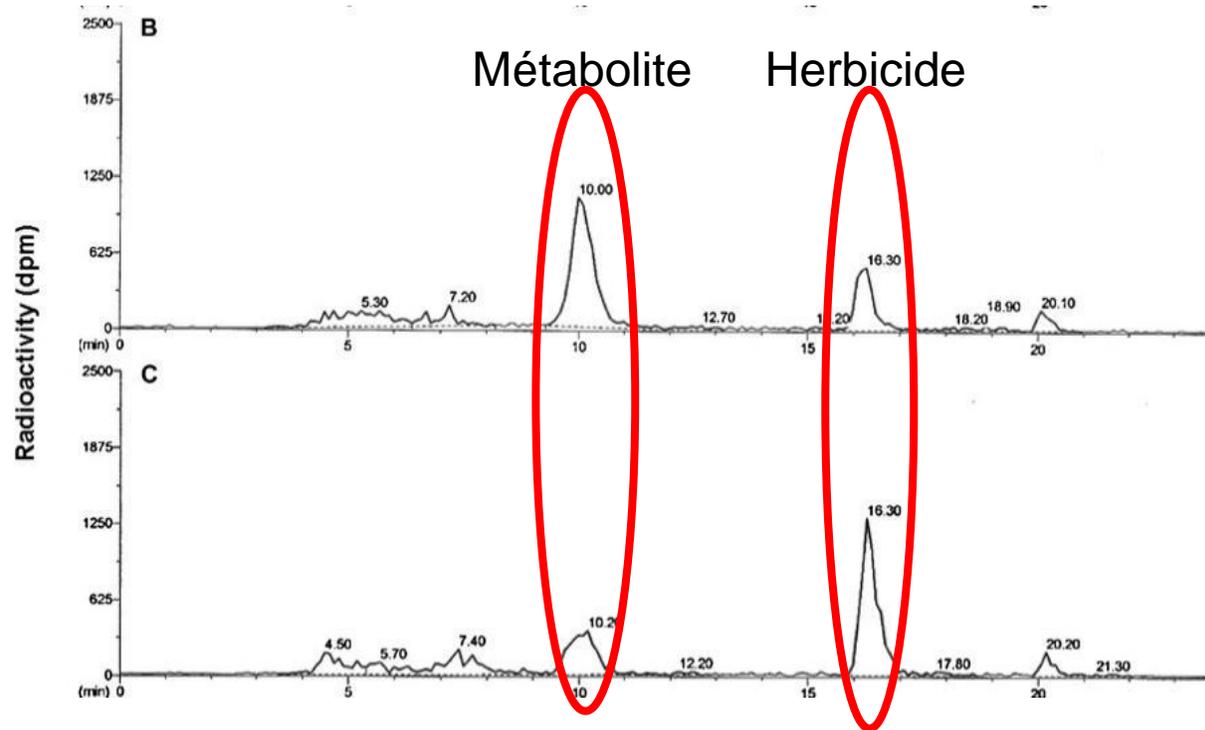
Analyses des activités enzymatiques

- Extraits protéiques :
 - Sur abdomen (conservation -80°C)
- Activités enzymatiques :
 - Glutathion-S-Transférase (**GST**)
 - Estérases (**EST**) : 2 types de substrat
 - α -naphtyl acétate
 - para-nitrophenyl acétate
 - Oxydases à fonction multiple (**MFO**)



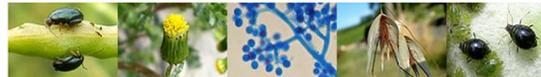
Tests biochimiques:

Analyses des activités enzymatiques par mesure du métabolite



Résistant

Plus sensible



Tests biochimiques: quantifier une protéine directement



PPP



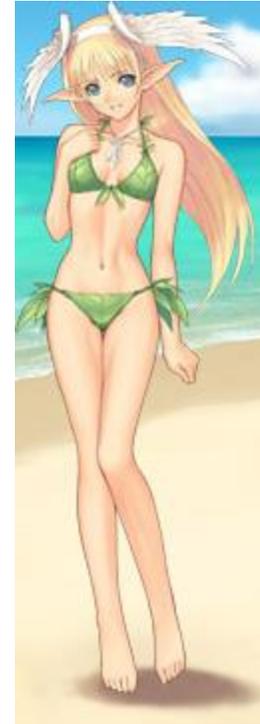
GST



Estérase

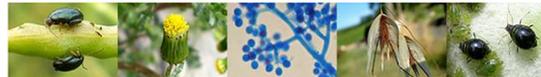


P₄₅₀



Cible

Grande diversité des mécanismes de dégradation

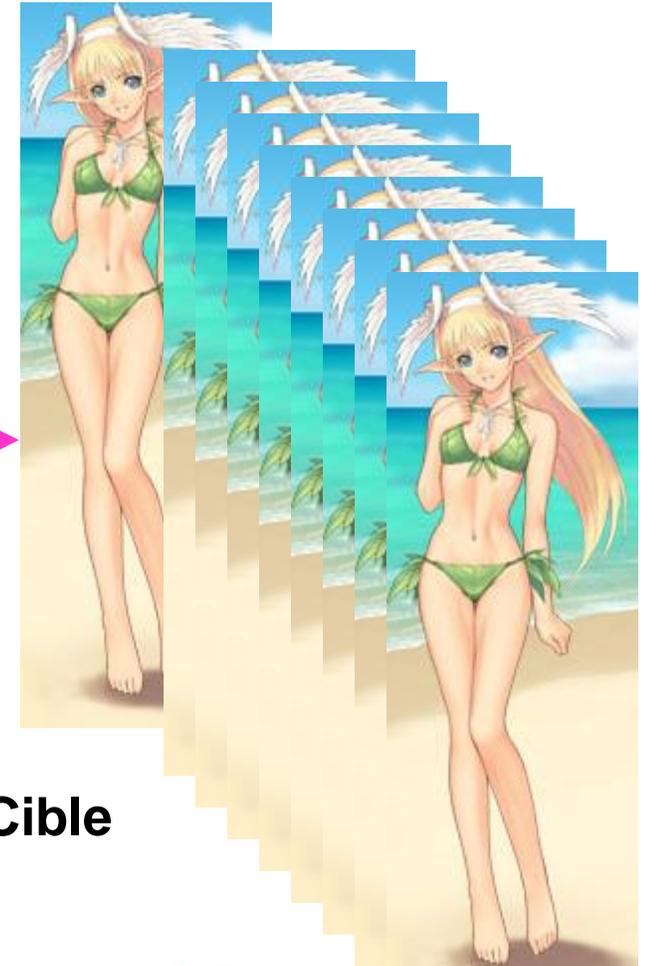


COLLOQUE RÉSISTANCE AUX PESTICIDES 14 ET 15 FÉVRIER 2019 À MONTRÉAL

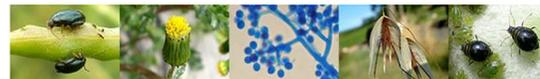
Tests biochimiques: quantifier si accumulation de la cible

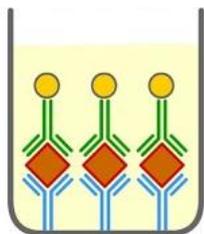
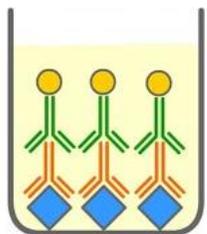


PPP



Cible





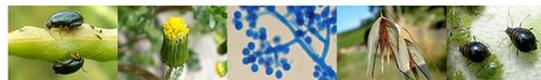
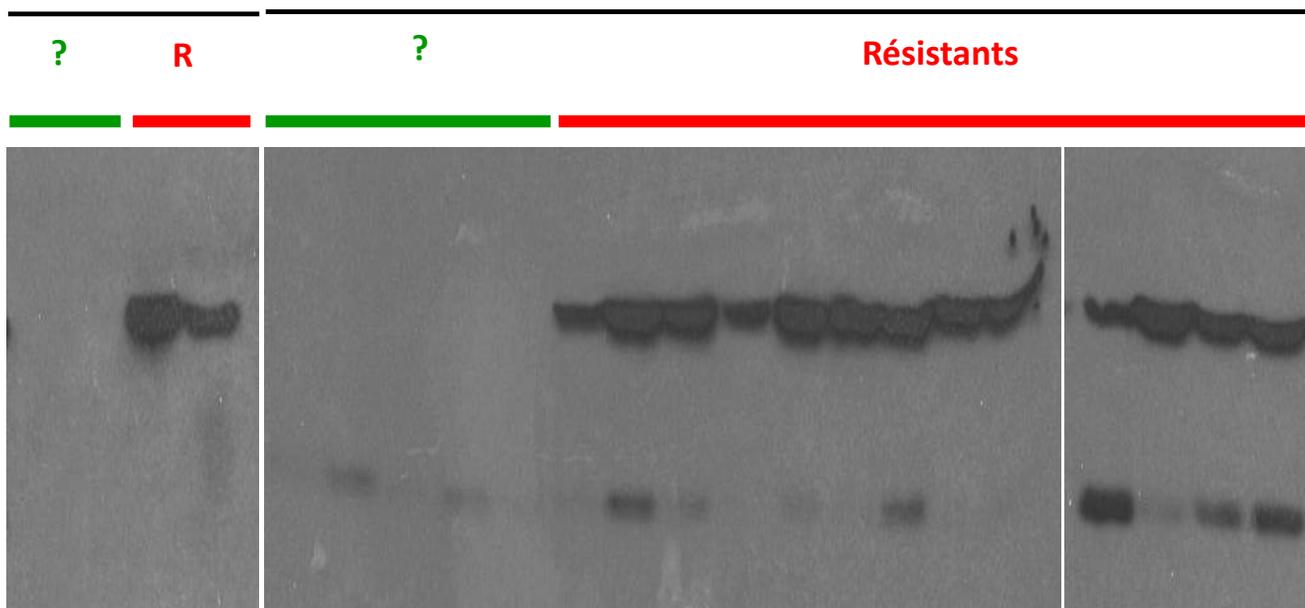
immunologiques

de la quantité de protéine

Potentiellement miniaturisable

A. palmeri

K. scoparia



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

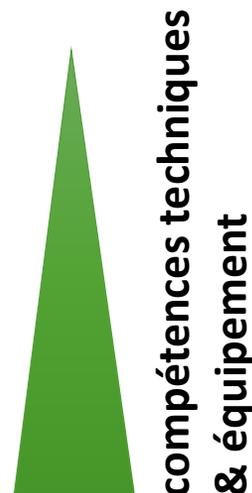
~~NON~~ : tests biologiques

OUI : tests biochimiques

❖ Temps & argent (temps = argent)

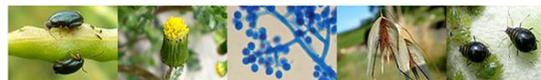
\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

~~\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)~~



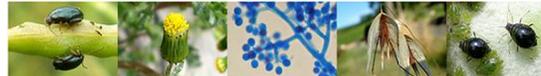
❖ Qui fait l'analyse?

- ~~— cultivateur~~
- ~~— technicien du champ~~
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche

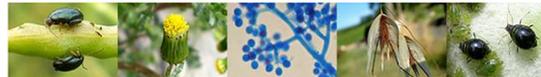
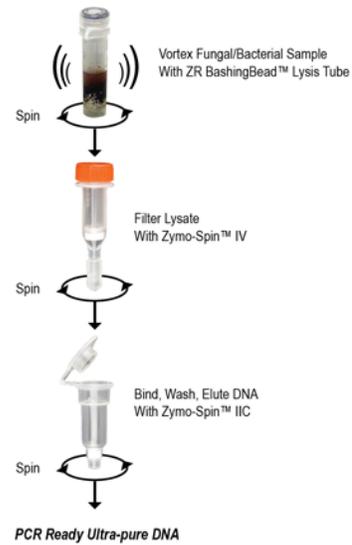
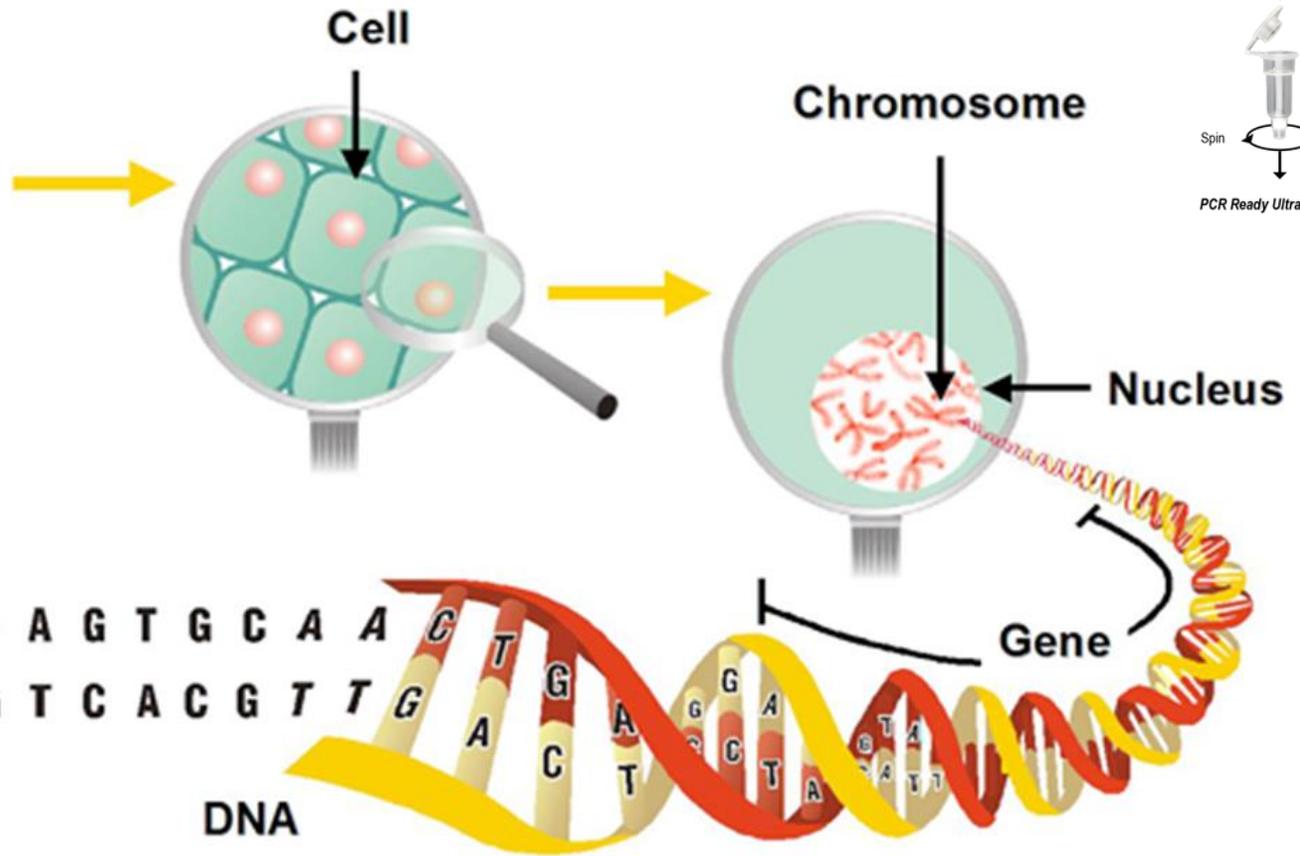
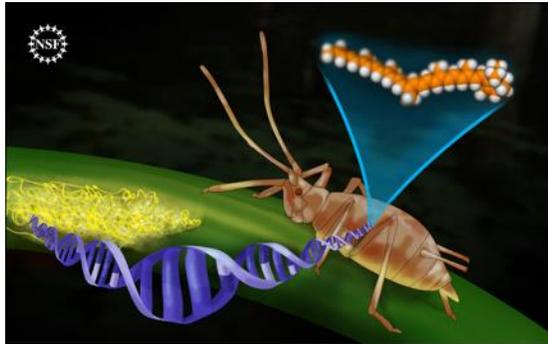


03_Tests moléculaires

-
- Connaissance au préalable
- des mutations ou du mécanisme de résistance



Tests moléculaires: Les quatre bases génétiques



Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

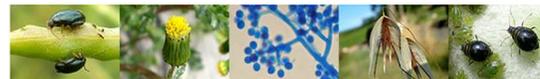
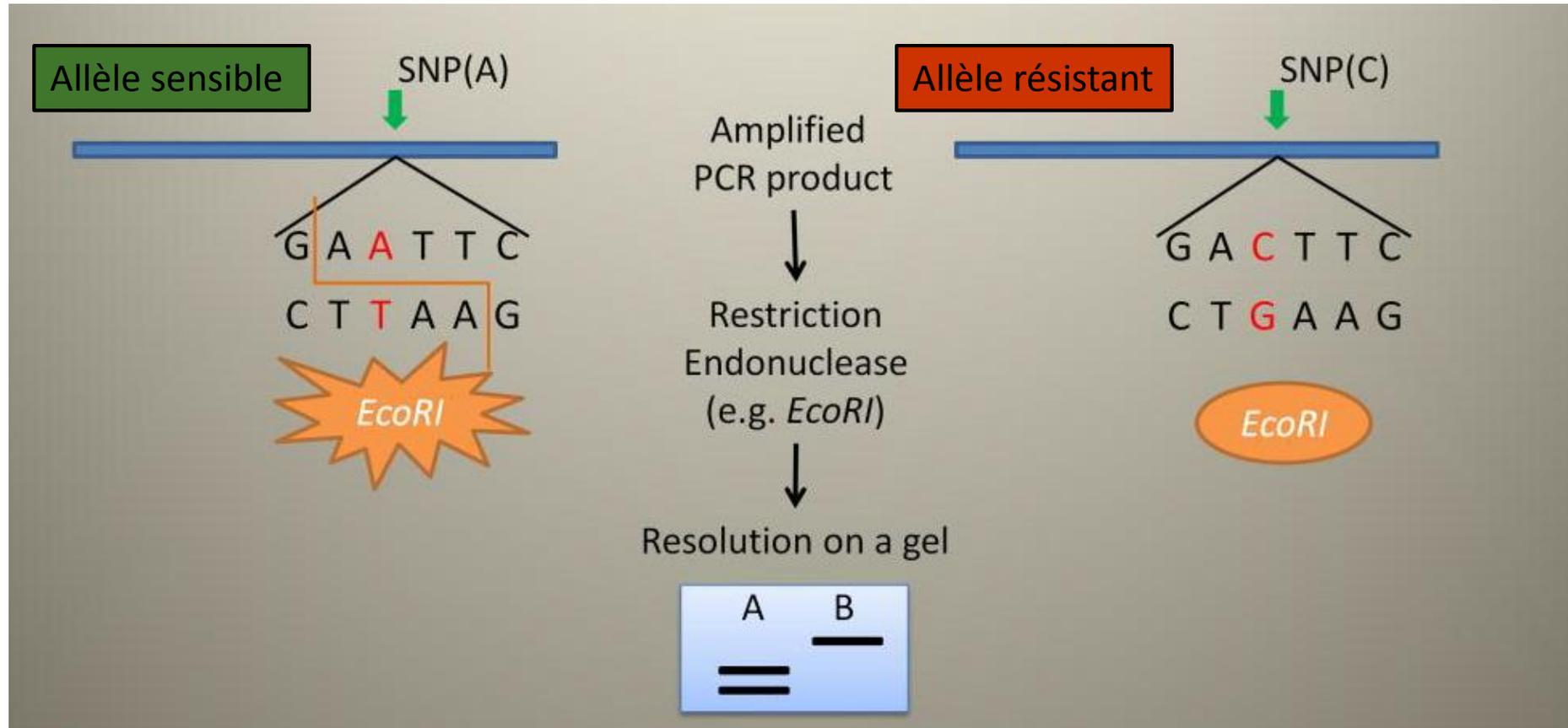
Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

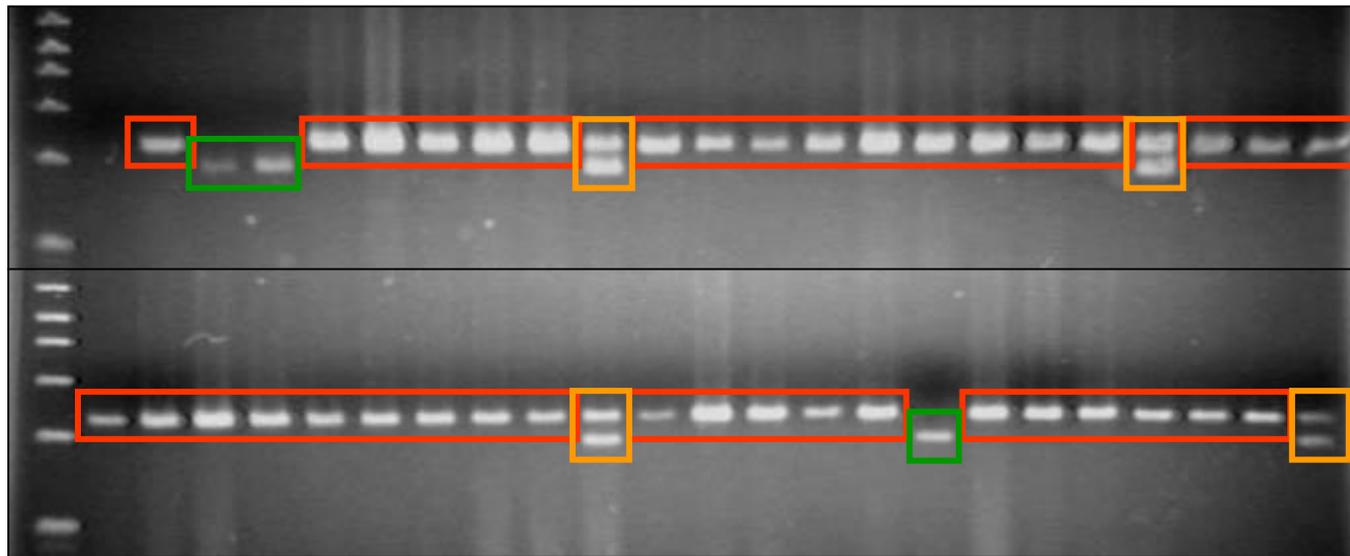
Génotypage par PCR « low-tech »



Génotypage par PRC/RFLP



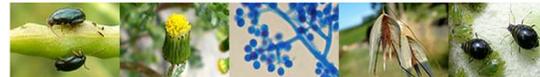
Échantillons



Homozygotes
résistants (R)

Hétérozygotes (R)

Homozygotes
sensibles (S)



Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

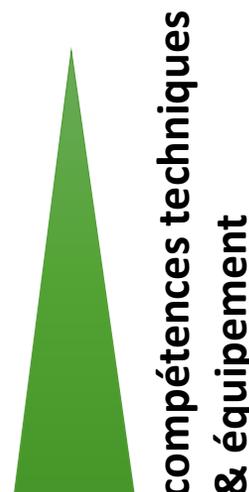
~~NON~~ : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

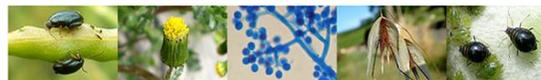
\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)



❖ Qui fait l'analyse?

- ~~— cultivateur~~
- ~~— technicien du champ~~
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche



Tests moléculaires

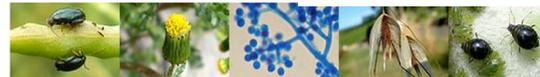
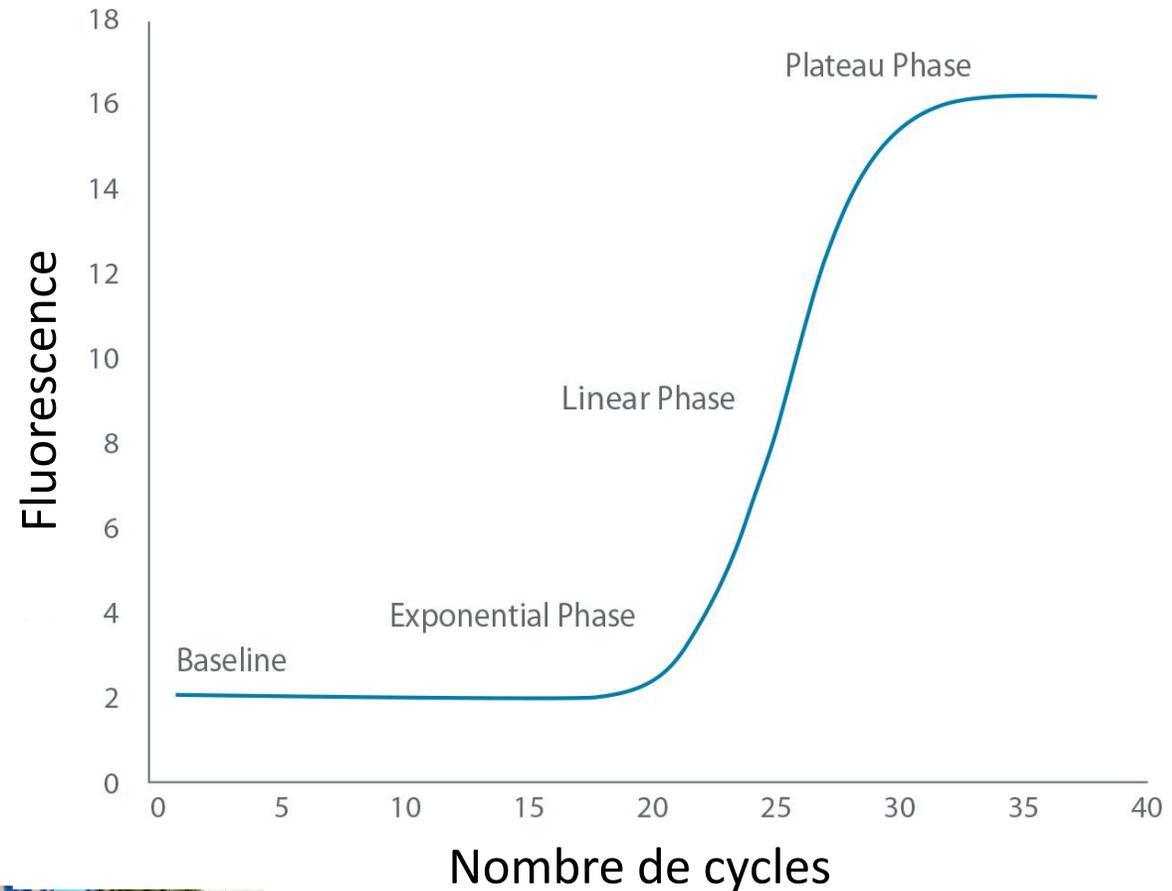
détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

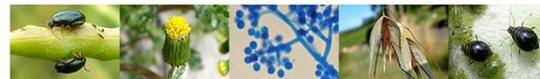
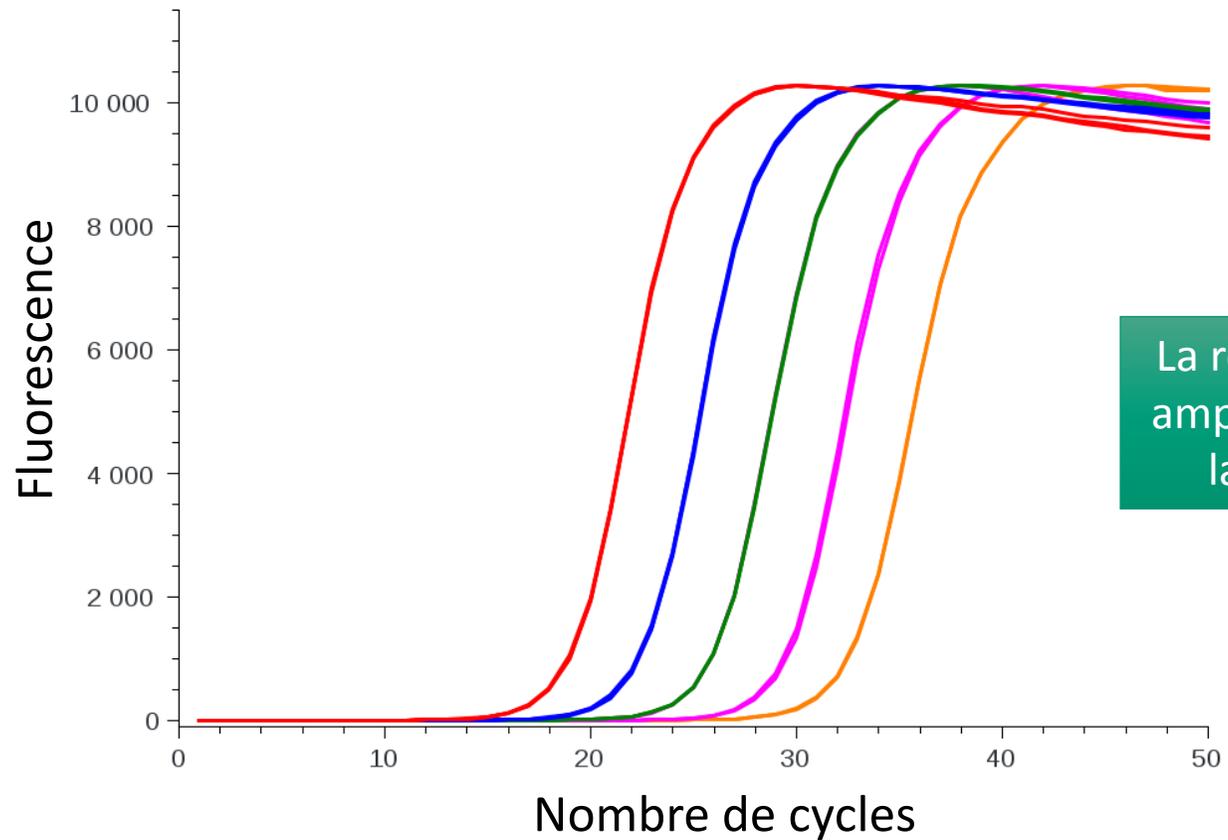
Génotypage par PCR « high-tech »: qPCR

- Suivi en temps réel de la réaction d'amplification d'ADN

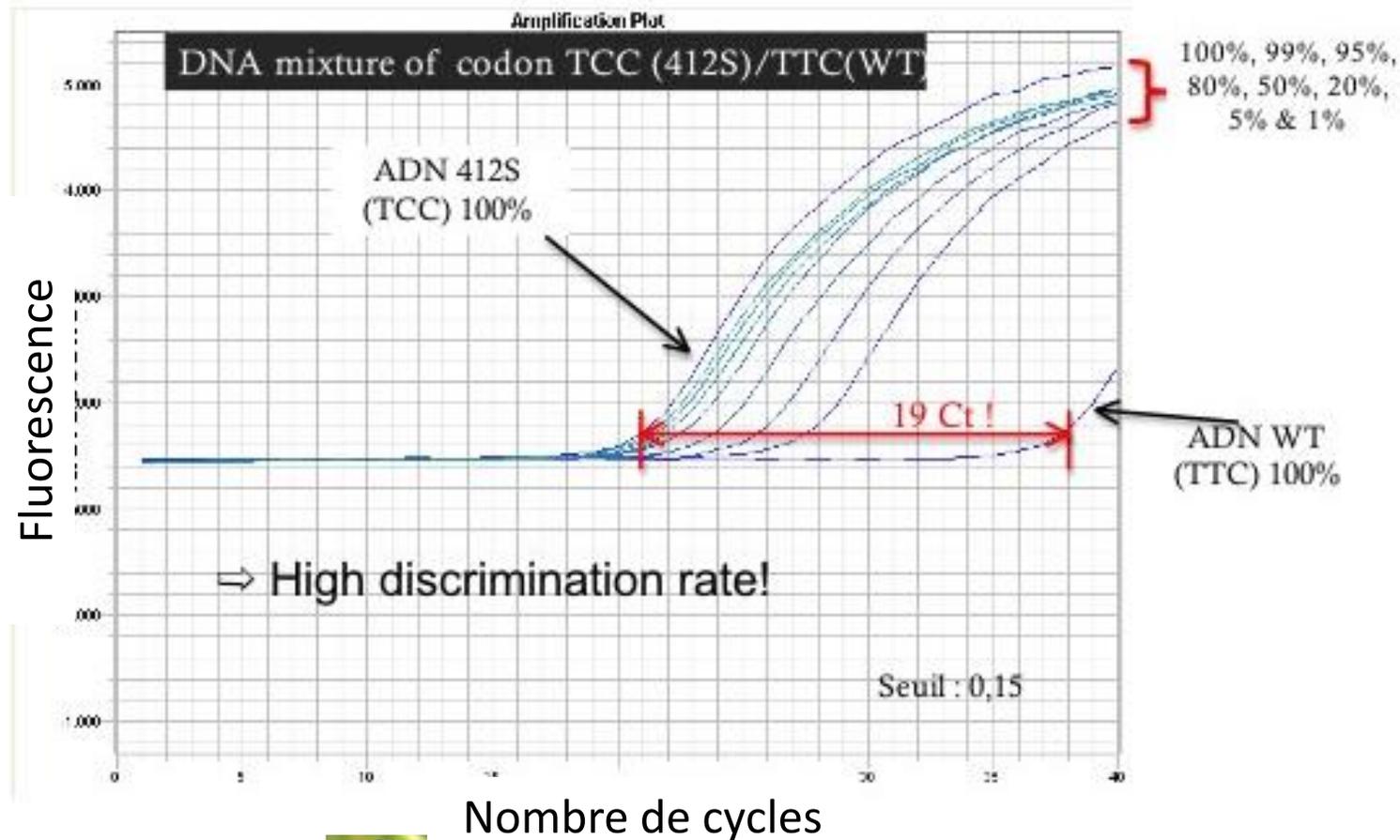


Génotypage par PCR « high-tech »: qPCR

- Suivi en temps réel de la réaction d'amplification d'ADN



Génotypage par PCR « high-tech » : qPCR

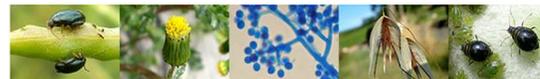
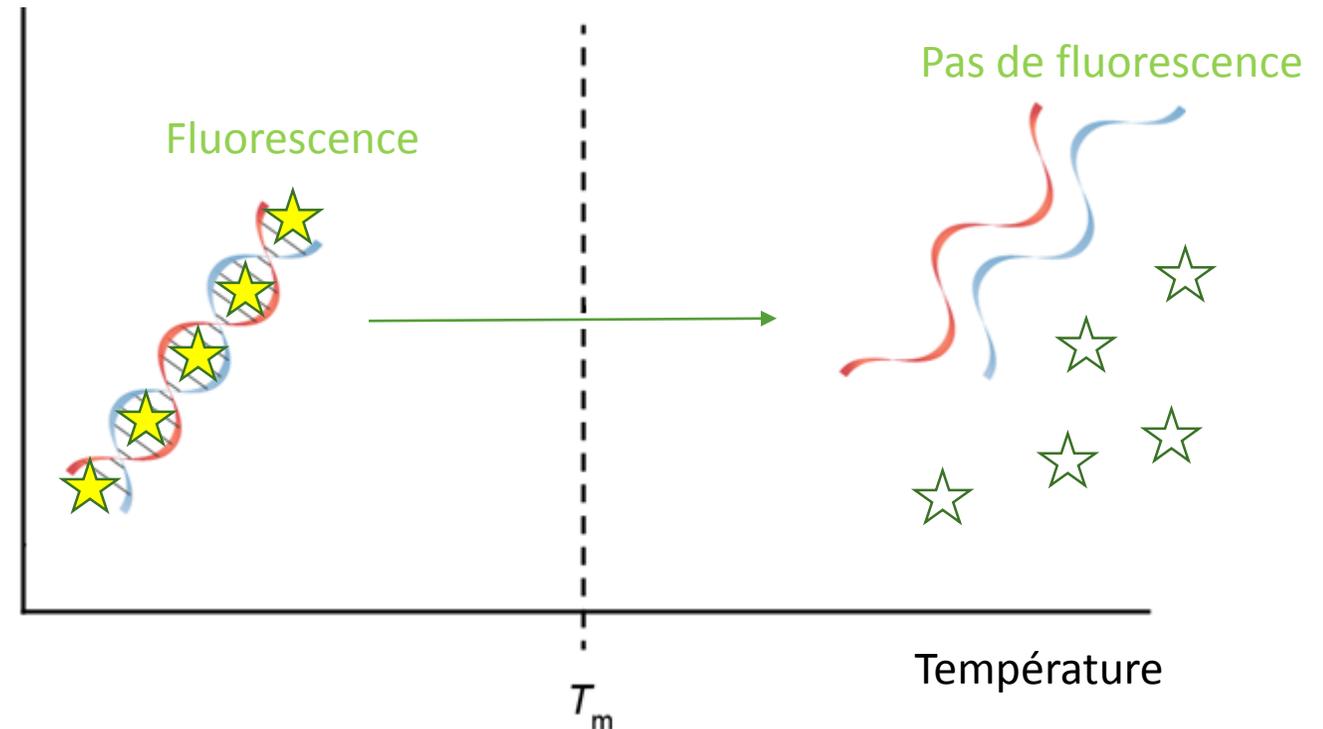


Quantification possible de la proportion de chaque allèle de manière très sensible



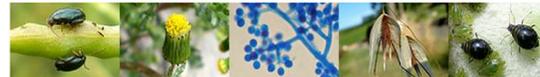
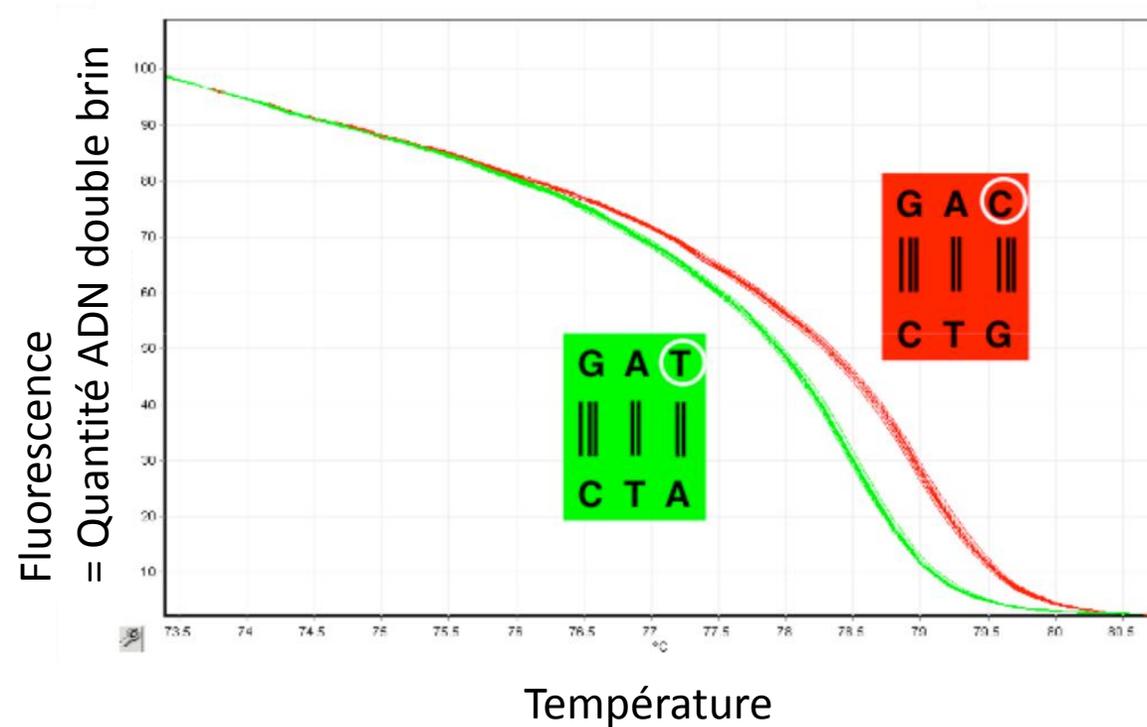
Génotypage par PCR « high-tech »: HRM (High Resolution Melt curve analysis)

- Ouverture de la double hélice d'ADN dépend de la température



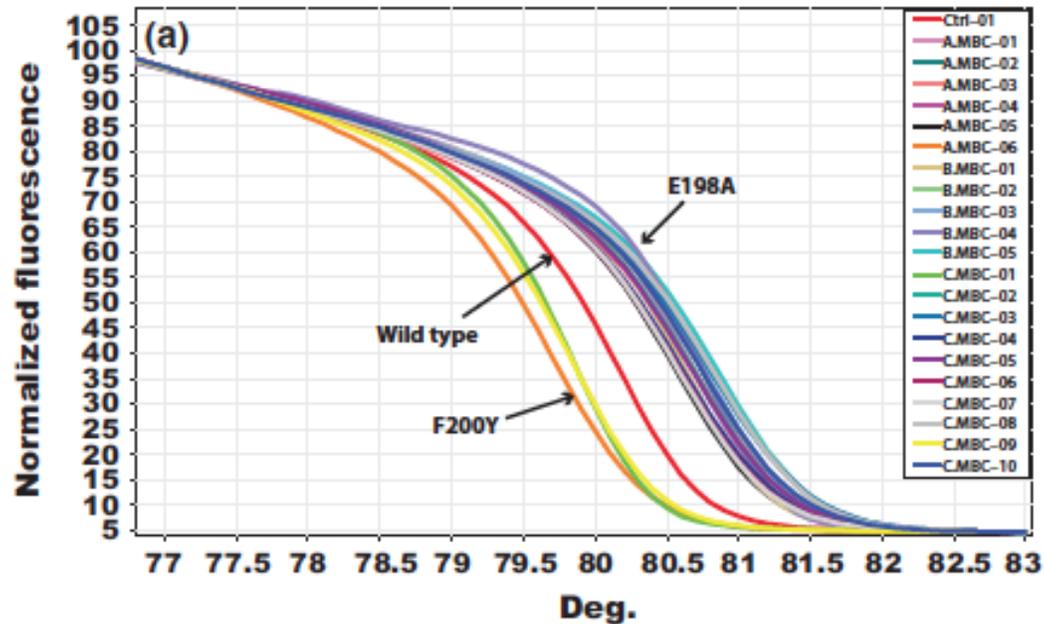
Génotypage par PCR « high-tech »: HRM (High Resolution Melt curve analysis)

- Ouverture de la double hélice d'ADN dépend de la température
- la courbe de fusion diffère selon le polymorphisme

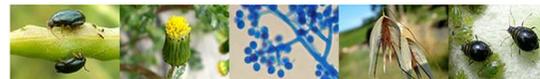
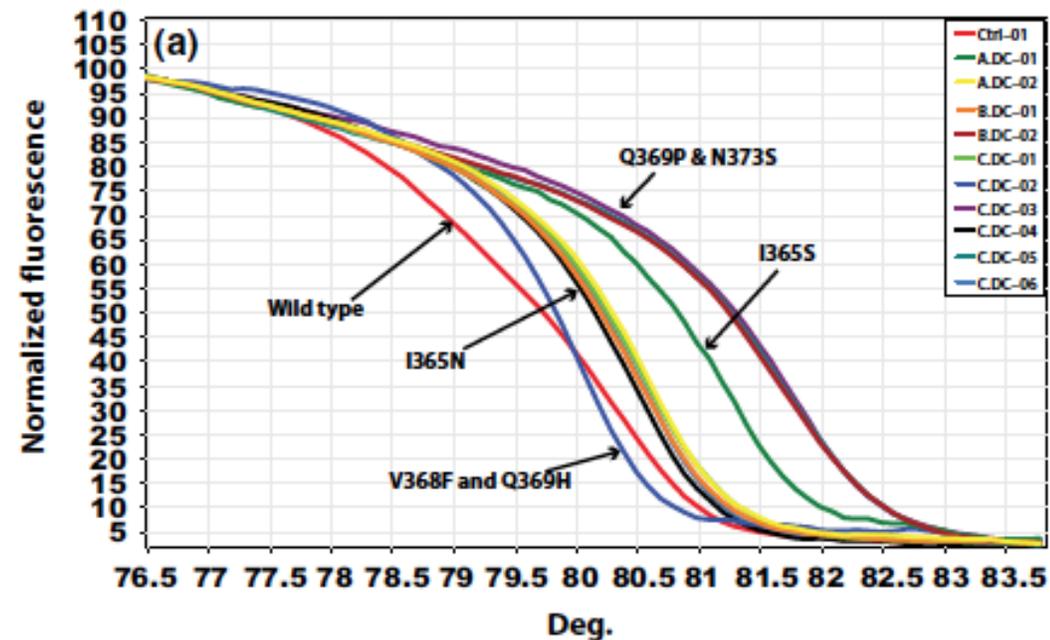


Génotypage par PCR « high-tech »: HRM (High Resolution Melt curve analysis)

benzimidazole-resistance mutations



dicarboximide-resistance in *B. cinerea*



Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

Tests moléculaires

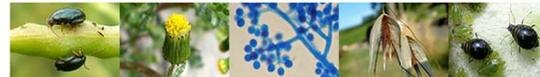
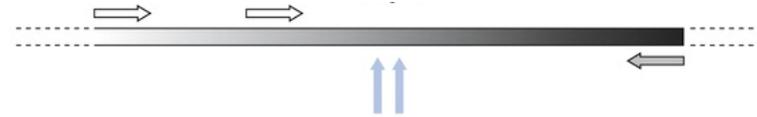
détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

PCR + séquençage

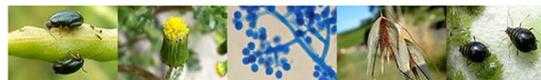
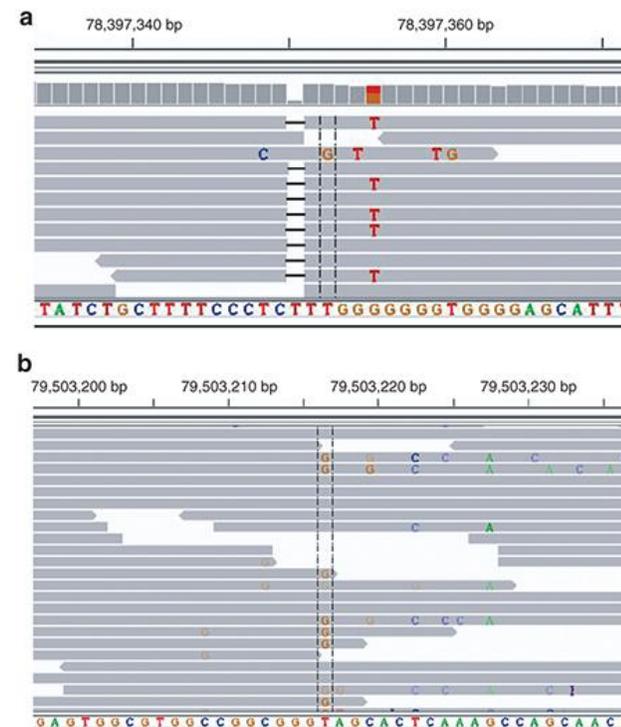
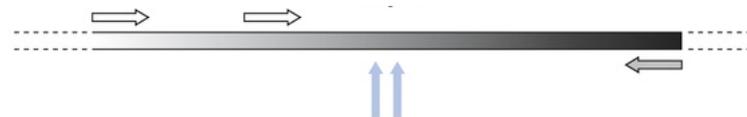
- Extraction et PCR



PCR + séquençage



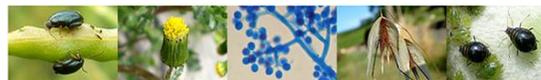
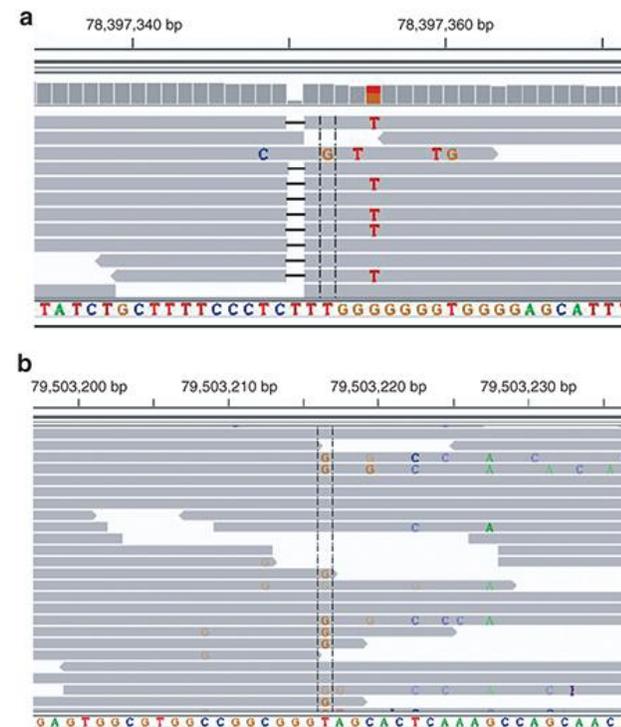
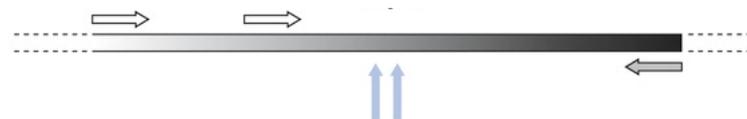
- Extraction et PCR
- Puis séquençage:



PCR + séquençage



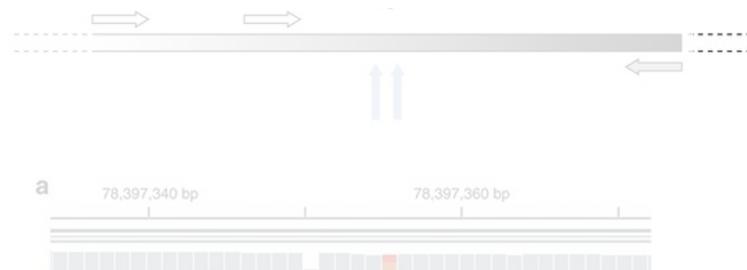
- Extraction et PCR
- Puis séquençage:
 - Bas débit : séquençage avec peu d'erreur mais individu par individu
 - Haut débit: séquençage avec erreurs mais séquences lues de nombreuses fois, plusieurs centaines d'individus dans la même analyse



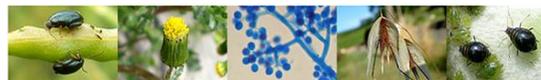
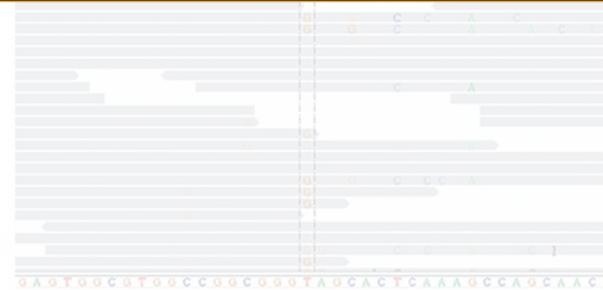
PCR + séquençage



- Extraction et PCR
- Puis séquençage:
 - Bas débit : séquençage avec peu d'erreur mais individu par individu
 - Haut débit: séquençage avec erreurs mais séquences lues de nombreuses fois, plusieurs centaines d'individus dans la même analyse



- Description de nouvelles mutations
- Nb de lectures (mutation)/nb de lectures total
=> Fréquence de la/des mutation(s) dans la population
- **Mais analyses bioinformatiques**



PCR/RFLP vs. PCR + Illumina

Recherche de RLC à des inhibiteurs de l'ALS

➤ Analyse par PCR/RFLP

96 populations × 50 plantes × 7 codons
(122, 197, 205, 376, 377, 574, 653, 654)

=

33 600 PCR + 33 600 digestions + 33
600 électrophorèses

C'est long!

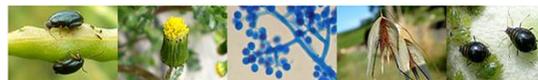
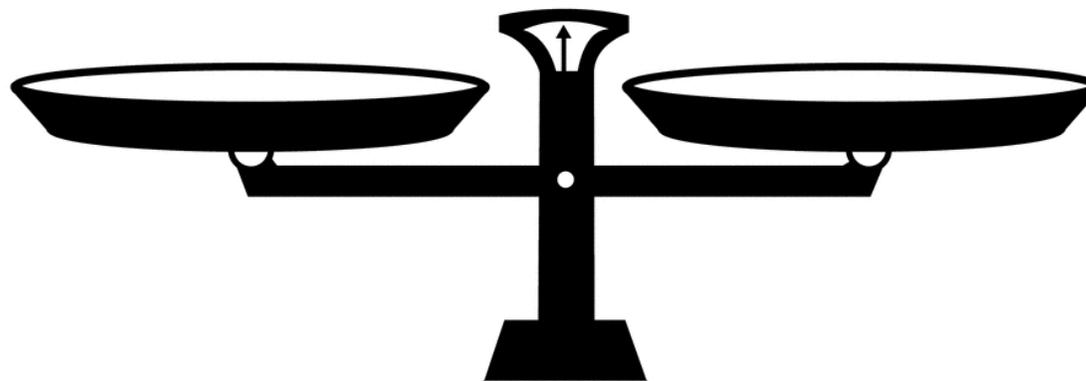
➤ Analyse par PCR + Illumina

96 populations de 50 plantes × 3 PCR x 2 duplicats
(codons 122 à 654)

=

576 PCR puis 1 run Illumina (20Mb)

C'est MOINS long!



Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

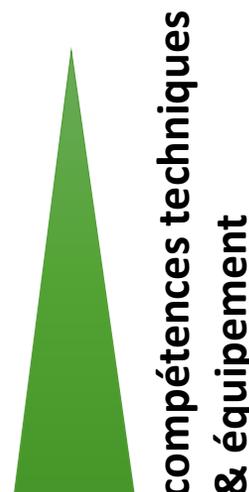
~~NON~~ : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

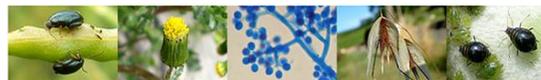
~~\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)~~

\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)



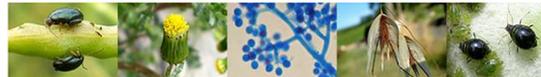
❖ Qui fait l'analyse?

- ~~— cultivateur~~
- ~~— technicien du champ~~
- ~~— conseiller technique/institut technique~~
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche



04_Tests moléculaires proches du champ

- Amplification isothermique (LAMP, TwistDx®)



Tests moléculaires

détection & quantification



Méthode	Objectifs	Résistance considérée	Avantages	Limites	Exemples de techniques
PCR « low tech » de génotypage de mutation	Détection	RLC	-Simple à concevoir -Bon marché -Equipement basique		PCR-RFLP, CAPS, dCAPS, PCR allèle spécifique
PCR « high tech » de génotypage de mutation	Détection Quantification	RLC RNLC	-Possibilité d'analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Réactifs et matériels chers	PCR quantitative, HRM (Courbe de fusion de haute résolution)
Amplification isothermique	Détection	RLC	-Bon marché -Haut débit possible	-Complicé à concevoir -Equipements encore rares -Problème d'extraction et de contamination	LAMP, Recombinase Polymerase Amplification (RPA/TwistDx)
PCR + séquençage bas débit	Détection	RLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu	-Inadapté pour du haut débit	PCR suivi de séquençage Sanger
PCR + séquençage haut débit	Détection Quantification	RLC RNLC	-Détection de mutation inconnue sur une portion de gène connu -Analyse d'un très grand nombre d'échantillon en même temps	-Inadapté pour du bas débit -Besoin de matériels coûteux -Nécessite des analyses bioinformatiques -Gestion des erreurs de séquençage	PCR suivi de pyroséquençage, 454 ou Illumina

Critères de choix des tests

Connait-on les bases génétiques de résistance?

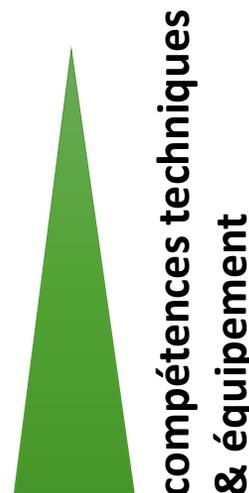
~~NON~~ : tests biologiques

OUI : tests moléculaires

❖ Temps & argent (temps = argent)

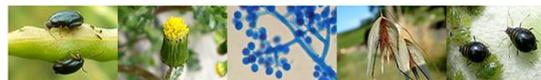
\$ test bon marché & robuste (essai proche du champ)

~~\$\$\$ essais à haute technicité, haut débit et haute sensibilité (essais de labo)~~

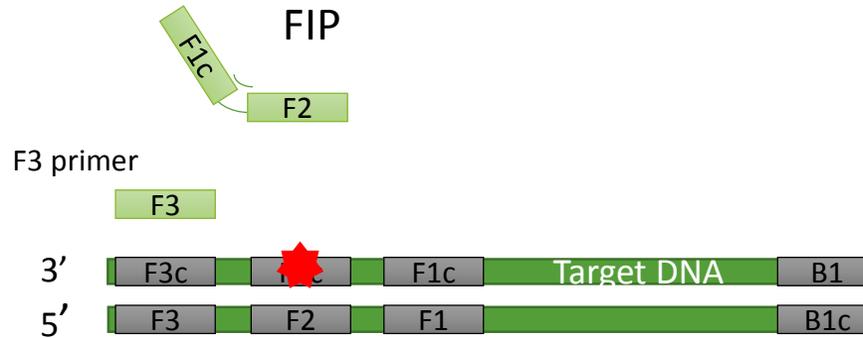


❖ Qui fait l'analyse?

- cultivateur
- technicien du champ
- conseiller technique/institut technique
- laboratoire d'analyses/prestataire
- laboratoire de recherche

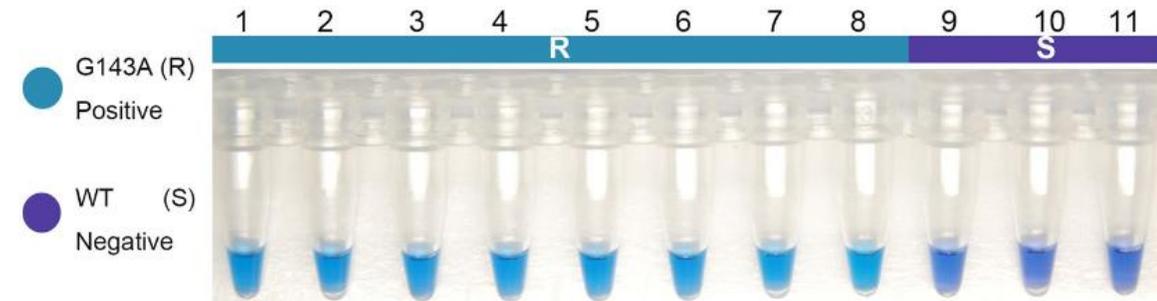
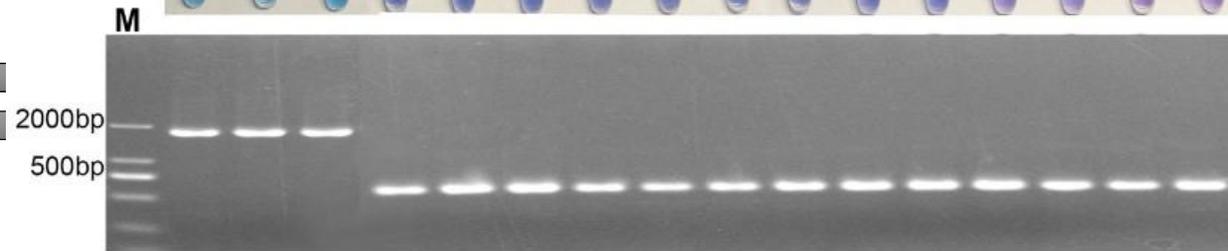
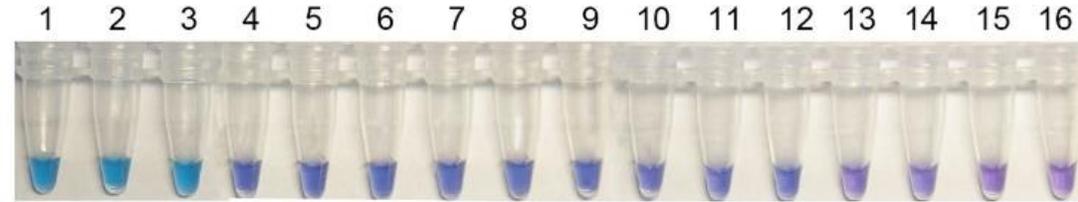


Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

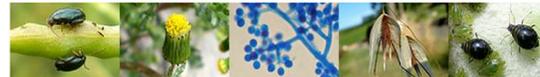


- jeu de 4-6 amorces couvrant la mutation
- amplification très rapide en boucle
- unique température: 65°C (instrument simple)
- détection simple: visuel, fluorescence et d'autres (peu ou pas d'instrumentation requise)

<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>



Dumbbell structure, dimeric,, multimeric



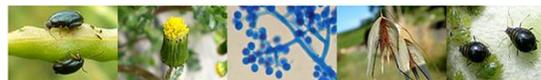
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Avantages

- robuste, simple; utilisation au champ possible à faible sensibilité
- **extraction d'ADN très basique** (bouilli)
- instrumentation simple
- rapide (<1 heure)
- **Réactifs bon marché** (selon méthode de détection)
- extrêmement spécifique!!
- détection par fluorescence très **sensible**

Inconvénients

- dessin d'amorces complexe,
- développement par laboratoire de recherche → **coût R&D élevé** pour chaque mutation
- faisabilité dépend de la séquence
- inhibition possible par extraits brutes
- **risque important de contaminations!!**

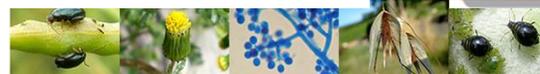
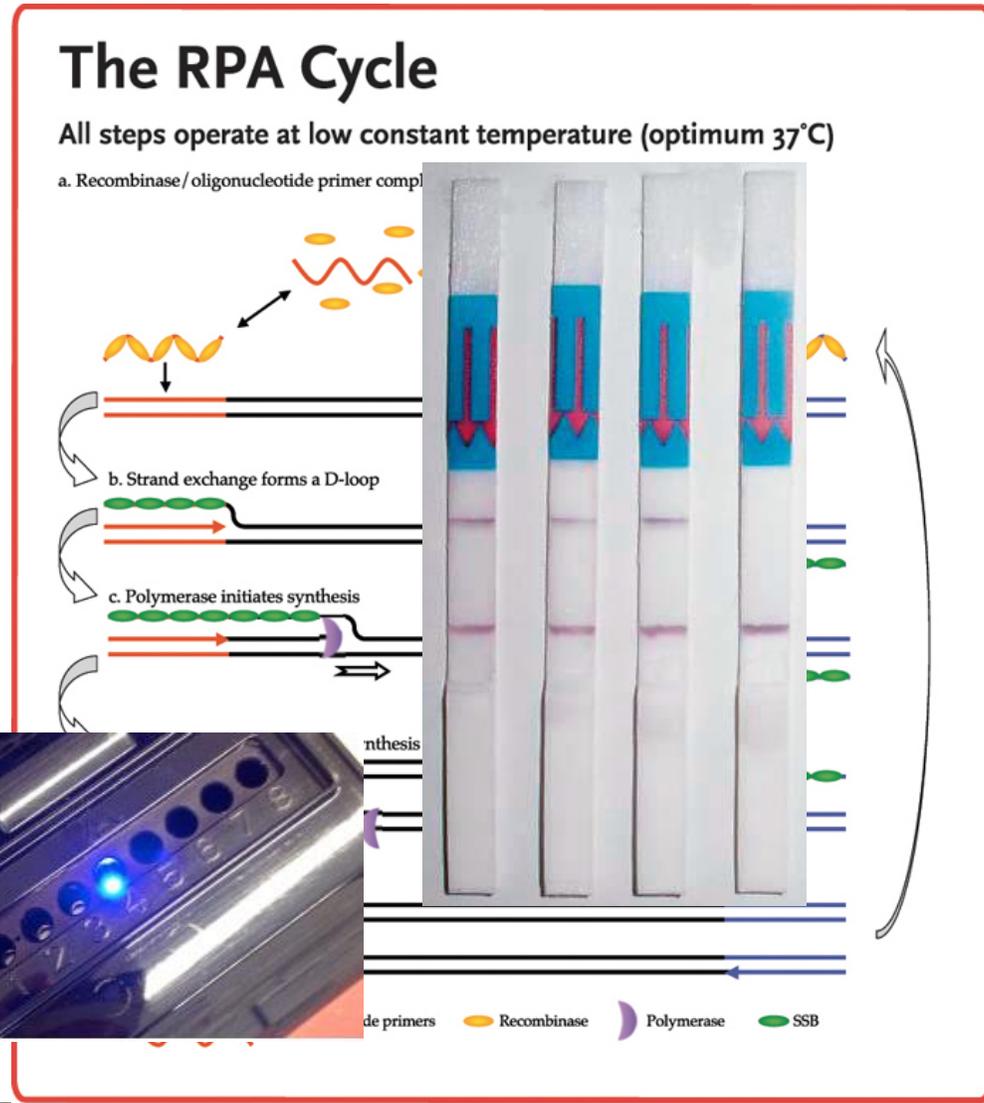


Recombinase polymerase amplification (RPA) TwistDx®

- jeu de 2 amorces couvrant la mutation + 3 enzymes;
- taux d'amplification extrêmement élevé;
- température unique: 37°C (incubateur simple)
- détection simple: fluorescence (appareil simple instruments), test électrophorèse à bandelette



<https://www.youtube.com/watch?v=tV8DvDqcoZE>



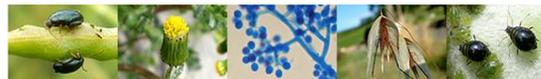
Recombinaise polymerase amplification (RPA) TwistDx[®]

Avantages

- robuste, **simple**, proche du champ
- **réaction à TA ou 37°C**
- pas d'instrument « high-tech »
- extrêmement **sensible!!**
- spécifique selon l'essai
- **extrêmement rapide: 10-12 min!**
- **dessin d'amorce plus simple que pour LAMP**
- **multiplexage possible** → détection de mutations multiples

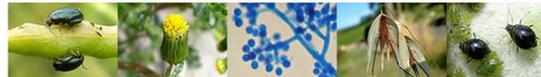
Inconvénients

- **extraction d'ADN pure**
- artefacts
- **Prix des réactifs**: nettement plus cher que LAMP (kit, probes)
- faisabilité dépend de la séquence
- **risque important de contaminations!!**



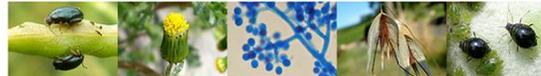
Conclusions

- Il faut des méthodes **précises, sensibles et reproductibles** pour le suivi des résistances chez les bio-agresseurs.
- Ces méthodes doivent détecter les génotypes (individus) résistants tant que leurs **fréquences sont faibles**
→ adapter les stratégies de protection
- **Quelle option choisir?** Des analyses couteuses, high-tech dans des laboratoires spécialisées ou des méthodes simples, rapides et robustes (=proches du champ)?
- La résistance est un processus évolutif: la **détection aura toujours un temps de retard sur l'évolution!**
- Il faudra toujours actualiser les essais haut-débit ou "high-tech"
- **Les essais biologiques** resteront **absolument nécessaires** pour la détection de nouvelles résistances émergentes chez les insectes, champignons et adventices



Merci de votre attention

Questions, discussion!



Merci de votre attention

