SeqDetectVeg : un projet majeur visant à développer des outils de séquençage de nouvelle génération (NGS) pour la détection multi-cible de pathogènes bactériens et fongiques transmis par les semences potagères

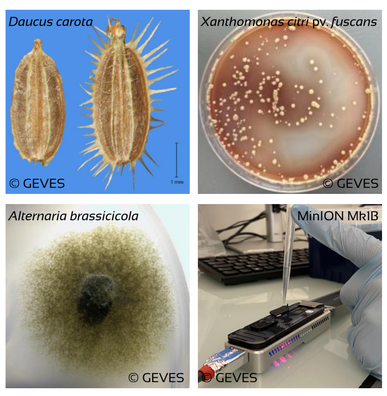
M. Ruh[1], C. Andro[1], A. Baloche[1], N. Denancé[1], M. Jousselin[1], L. Landais[1], A. Lê Van[1], D. Lucas[1], J. Malabarba[1], L. Martin[1], E. Mathot[1], C. Tranchant[1], C. Tribodet[1], M. Marchi[2], M. Bahut[2], S. Balzergue[2], M. Barret[2], M. Briand[2], C. Centa[2], T. Guillemette[2], N. Guschinkaya[2], Y. Kouki[2], C. Marais[2], P. Poupard[2], M. Simonin[2], G. Frémont[3], S. Tourneur[3], J. Delisle[4], T. Baldwin[5] and C. Joffrion[5]

[1] GEVES (Group d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences), France. [2] Université d'Angers, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR QUASAV, France. [3] Vilmorin-Mikado SA, France. [4] HM. Clause SA, France. [5] Sakata Vegetables Europe, France

Mylene.ruh@geves.fr

Created with BioRender.com

Contexte



Les semences permettent la diffusion de ressources génétiques dans le cadre de programmes de sélection, de multiplication et de commercialisation de variétés à travers le monde. En parallèle, les semences sont également porteuses d'une diversité de micro-organismes (microbiote), qui peuvent être bénéfiques ou néfastes pour la santé des plantes. La disponibilité de méthodes précises et à haut débit pour identifier rapidement les lots de semences saines est donc essentielle pour la filière semences.

SeqDetectVeg est un projet collaboratif français (2023-2028) qui vise à développer et valider des méthodes de détection de multiples pathogènes bactériens et fongiques dans des lots de semences potagères à l'aide du séquençage de nouvelle génération (NGS), ces méthodes seront proposées comme étape de pré-criblage en complément des méthodes d'analyse sanitaire reconnues (ISTA, ISHI, OEPP...).

Premiers résultats et Prochaines étapes du projet SeqDetectVeg

Premiers résultats pour les cibles BACTERIENNES : Séquençage Illumina avec le marqueur gyrB afin d'évaluer les paramètres optimaux pour la détection des pathogènes cibles

Protocole de détection par métabarcoding

1 - Sous-échantillon d'un lot de semences

245 échantillons de semences caractérisés en analyse sanitaire : **19 espèces végétales** et **18 pathogènes bactériens** (0 à 3 par échantillon)

→ Plus grande diversité d'ASV pour les Fabacées et les Cucurbitacées

4 tailles de sous-échantillons de semences testés : **500, 1 000, 5 000 et 10 000 semences**

→ Meilleurs taux de détection avec 500 et 1 000 semences

Entre 500 and 1 000 semences testées

2- Macération des semences

15 protocoles de macération/broyage des semences testés : **4 volumes de tampon** par gramme de semences, **2 températures** de macération, **2 durées** de macération, **avec ou sans agitation** et **suivi ou non d'une étape de broyage** des semences dans le macérat

→ Meilleurs taux de détection avec moins de 3 ml de tampon par gramme de semences, une macération toute la nuit à 4°C avec agitation et une étape de broyage

Paramètres testés :
- 2 à 11 mL de tampon
- 4°C toute la nuit avec agitation
- Avec ou sans broyage

3 - Extraction ADN

5 protocoles d'extraction d'ADN testés : 1 protocole par **lyse alcaline**, 3 kits d'extraction sur **colonnes de silice** et 1 kit d'extraction par **billes magnétiques**

→ Meilleurs taux de détection avec la lyse alcaline ou les kits d'extraction sur colonne de silice

6 protocoles de concentration de la charge bactérienne testés

→ Meilleurs taux de détection avec la concentration du culot et l'enrichissement

1 kit d'extraction sur colonnes de silice testé : **NucleoSpin® 96 Food (Macherey-Nagel)**

4 - Amplification du marqueur

gyrB + MiSeq (Illumina)

ITS long-read + MinION (Oxford Nanopore)

5 - NGS

6 - Analyses bioinformatiques

Clavibacter ... *Pseudomonas*

Alternaria ... *Fusarium*

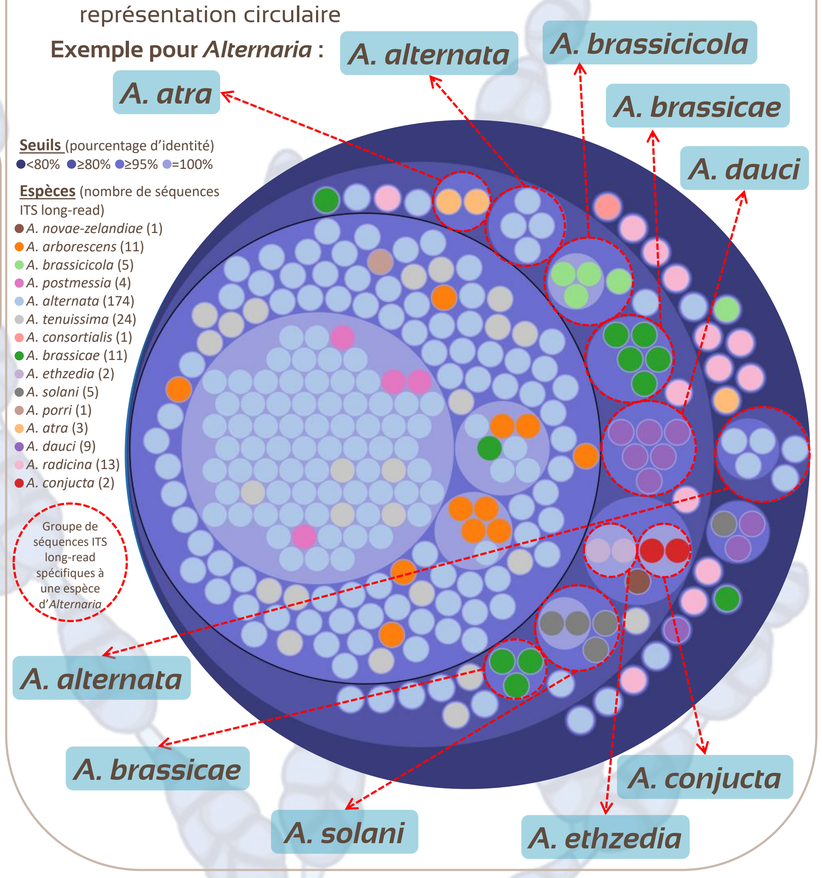
7 - Identification de l'espèce

Premiers résultats pour les cibles FONGIQUES : Mise au point d'un marqueur ITS long-read pour permettre l'identification au niveau de l'espèce avec la technologie d'Oxford Nanopore

Analyse *in silico* du marqueur ITS long-read :

- **Collection de 11 815 séquences ITS long-read** d'espèces cibles (*Alternaria, Fusarium, Diaporthe, Stagonosporopsis*...)
- **Outil KI-S** (Briand *et al.*, 2021) : calcul du pourcentage de 15-mers partagés entre toutes les séquences ITS long-read et représentation circulaire

Exemple pour *Alternaria* :



Evaluation de la performance diagnostique :

203 échantillons positifs + 42 échantillons négatifs - toutes méthodes de préparation des échantillons confondues

	Attendu +	Attendu -	Sensibilité diagnostique	Spécificité diagnostique
Obtenu +	118	16	58 %	62 %
Obtenu -	85	26		

Evaluation *in vitro* du marqueur ITS long-read :

Echantillon	Contamination fongique attendue
Courgette	*Stagonosporopsis cucurbitacearum*
Mâche	*Stagonosporopsis valerianellae*
Carotte	*Alternaria dauci* et *Phoma* sp.
Soja	*Diaporthe*/complexe *Phomopsis*
Tomate	*Fusarium oxysporum*
Contrôle positif (pool d'ADNg)	14 ADNg caractérisés appartenant à des isolats d'*Alternaria, Fusarium, Plenodomus, Penicillium, Rhizoctonia* et *Stagonosporopsis*
Contrôle positif (1 ADNg)	1 ADNg caractérisé appartenant à 1 isolat d'*A. solani* avec plusieurs copies du marqueur ITS
Contrôle négatif	sain

Conclusions sur le marqueur ITS long-read :

→ *In silico* : **Quelques séquences** sont **spécifiques** au niveau de l'espèce mais **la majorité** sont **partagées** au niveau du genre

→ *In vitro* : **Amplification majoritaire des séquences ITS de plantes** à la place des séquences ITS fongiques

Prochaine étape pour les cibles FONGIQUES :

→ Premier essai de **détection par métagénomique** avec la technologie d'Oxford Nanopore prometteur

Prochaines étates pour les cibles BACTERIENNES :

→ **Sélection des meilleurs paramètres** de préparation des échantillons pour **l'amélioration et l'évaluation de la sensibilité analytique** de la méthode pour quelques couples hôte-pathogènes (en cours)

→ Nouvelle analyse bioinformatique utilisant la **base de données gyrB mise à jour** (en cours)

→ Développement d'un **outil bioinformatique permettant de détecter les ASV gyrB cibles** en complément de l'assignation taxonomique

©GEVES – Novembre 2026 – Tous droits réservés

R végétal 13ème édition des Rencontres du Végétal – 24-25 Nov. 2026 - Angers