

FICHE SYNTHÈSE

Volet 2 – Approche régionale et interrégionale

TITRE : DÉTECTION SIMULTANÉE DU VIROME DE LA VIGNE ET RÔLE DES FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES SUR L'EXPRESSION DES SYMPTÔMES DE VIROSE DANS LA VIGNE

ORGANISME : Université de Sherbrooke/Agriculture agroalimentaire Canada

COLLABORATEURS
Conseil des vins
du Québec

AUTEURS Mamadou L. Fall, Vahid J. Javaran et Peter Moffett

INTRODUCTION

L'industrie viticole du Québec vit une transformation inédite au niveau de l'expansion du nombre et de la taille des vignobles, ainsi que le virage vers des cépages non rustiques. Le secteur viticole québécois est confronté à de nouveaux défis pour maintenir sa croissance et rester compétitif sur un marché mondialisé. Parmi ces défis, l'association des vignerons du Québec (AVQ) a identifié les virus, dans son plan de recherche et développement, comme étant l'un des principaux facteurs biotiques limitant la production. Le plan directeur en recherche et innovation de l'industrie vitivinicole au Québec identifie le besoin d'adaptation et d'innovation pour la détection et le suivi des virus en viticulture. En effet, les virus occasionnent des pertes considérables dans toutes les régions viticoles du monde. Plus de 95 virus s'attaquent à la vigne, pouvant réduire sa vigueur, sa productivité ou la qualité des raisins. On sait qu'un bon nombre ces virus sont latents ou asymptomatiques. Par conséquent, si la gestion des maladies virales repose principalement sur la certification des plants de vigne et le dépistage précoce des virus, un outil de détection simultanée de l'ensemble des virus (virome) devient plus que nécessaire. Actuellement le laboratoire d'expertise et de diagnostic en phytoprotection (LEDP) du MAPAQ ne dispose pas d'un tel outil. L'objectif de cette demande est de développer une méthode robuste, rapide et peu coûteuse pour identifier tous les virus en utilisant des dispositifs de séquençage portables pour la détection précoce. L'outil servira à l'étude comparative du virome de vignes symptomatiques par rapport celui de vignes asymptomatiques afin de comprendre le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes.

OBJECTIFS

L'objectif général du projet est de développer une méthode robuste, rapide et peu coûteuse pour identifier le virome de la vigne et de déterminer le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes. L'objectif 1 permettra de développer une méthode de détection des virus de la vigne robuste, rapide et peu coûteuse que pourra notamment utiliser le LEDP. L'outil développé dans l'objectif 1 sera revalidé durant les activités de l'objectif 2 qui permettra d'étudier le rôle que jouent les facteurs biotiques et abiotiques sur l'apparition de symptômes de virose, afin de mieux interpréter les résultats de séquençage.

Objectif 1 : Développer un outil moléculaire pour identifier simultanément tous les virus (virome)

Objectif 1.1 : Établir le meilleur protocole d'extraction d'acides nucléiques et de préparation des bibliothèques de séquençage. Objectif 1.2 : Augmenter la rapidité de la détection des virus de la vigne

Les hypothèses spécifiques cherchent à évaluer la meilleure méthode d'extraction des acides nucléiques viraux pour une détection efficace des virus. La comparaison de l'extraction d'acide nucléique viral par ARN double brins et celui par ARN total est présentée à la figure 1A.

Objective 2 : Déterminer le rôle des facteurs biotiques et abiotiques sur le développement des symptômes de viroses dans la vigne.

MÉTHODOLOGIE

Des échantillons de feuilles de vigne infectées ont été collectés entre 2019 et 2022 dans huit vignobles du Québec et analysés en laboratoire pour comparer l'efficacité des méthodes d'extraction d'ARN (dsRNA et ARN total) (Figure 1A) dans la détection virale par séquençage nanopore et Illumina Miseq. Un flux de traitement des données a été développé pour analyser les séquences obtenues et affiner les résultats taxonomiques avec DIAMOND, MEGAN, BLASTn et BLASTx (Figure 1B). Des essais au champ ont suivi 120 plants asymptomatiques sur deux ans afin d'étudier leur virome et les conditions environnementales influençant l'expression des symptômes. Trois autres vignobles ont été sélectionnés pour analyser la réponse physiologique de la vigne via des échantillons foliaires collectés en été et en automne, dont les profils viromique, transcriptomique et métabolomique ont été établis. Parallèlement, une expérimentation en conditions contrôlées a exposé des plants infectés et sains à deux régimes de température pendant quatre mois pour évaluer l'impact des variations thermiques sur l'infection virale.

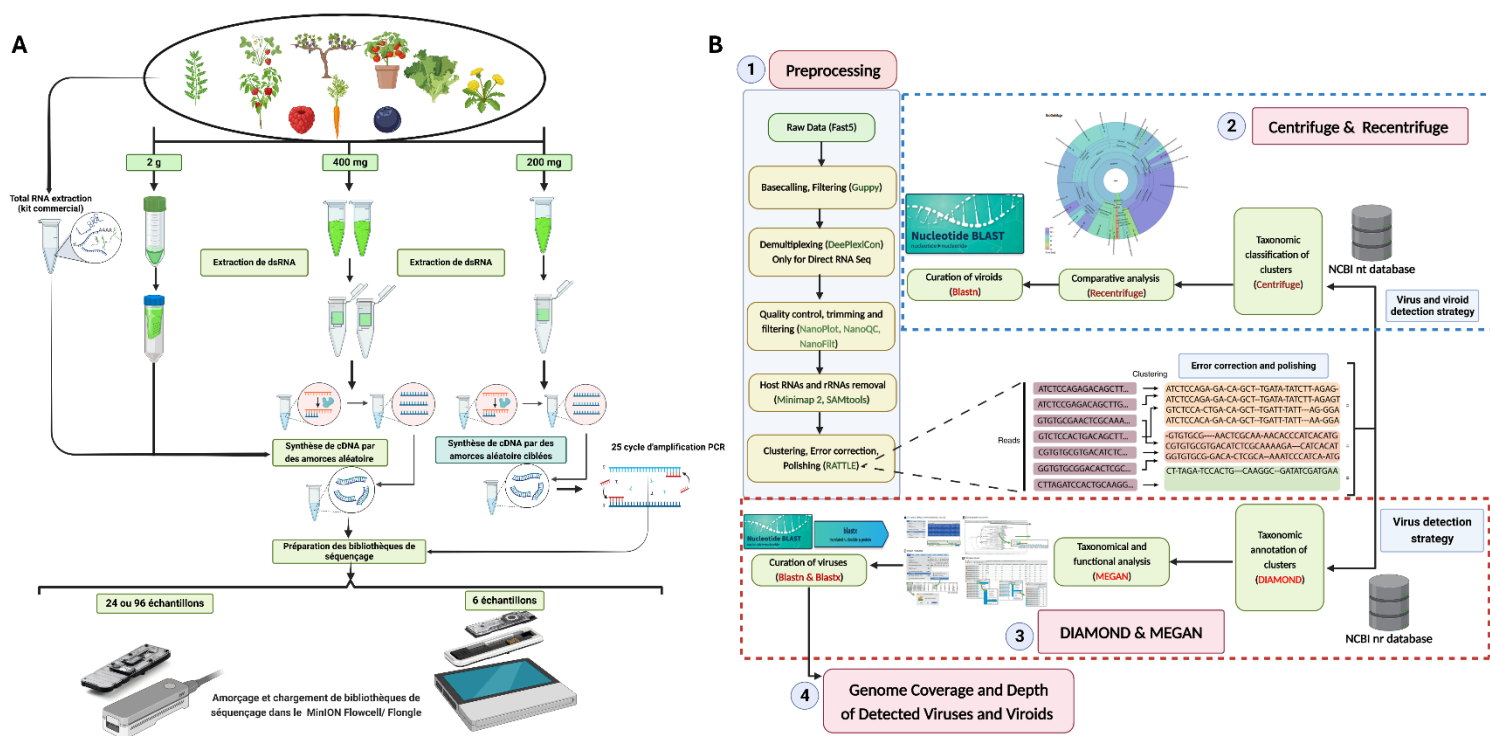


Figure 1. A, Protocole de comparaison entre l'extraction d'acides nucléiques viraux par ARN double brins et par ARN total. Biorender. **B,** Les étapes de traitement et d'analyse de données pour la détection des virus et des viroïdes de la vigne par séquençage nanopores. 1-Prétraitement des données brutes (à gauche): les données brutes ont été acquises via le logiciel MinKNOW, puis l'appel de base, le filtrage basé sur le score de qualité (<7), le démultiplexage, le découpage, la suppression des lectures d'hôte et le regroupement ont été effectués, suivis de correction d'erreurs et polissage, à l'aide de divers logiciels et progiciels. 2-Stratégie Centrifuge et Recentrifuge (en haut à droite) : les lectures prétraitées ont été classées taxonomiquement à l'aide de Centrifuge, suivies d'une analyse complète par Recentrifuge, qui a fourni une visualisation. 3-Stratégie DIAMOND + MEGAN (en bas à droite) : De plus, les mêmes lectures de l'étape précédente ont été alignées sur des séquences protéiques annotées (NCBI-nr) à l'aide de DIAMOND, puis MEGAN a été utilisé pour regrouper les séquences en fonction de leur taxonomie et de leur fonction. 4-Pour peaufiner les résultats taxonomiques, BLASTn et BLASTx ont également été exécutés.

RÉSULTATS

Les résultats de cette étude montrent que le séquençage dsRNAcD sur la plateforme Nanopore est une méthode efficace, rapide et économique pour la détection des virus et viroïdes de la vigne (Figure 2). Comparé au séquençage rdTotalRNA et au séquençage Illumina dsRNA-MiSeq, le séquençage dsRNAcD offre un meilleur rapport coût-efficacité (Tableau 1) et une plus grande sensibilité pour la détection des virus à faible abondance, produisant des résultats similaires à ceux du séquençage Illumina. L'analyse des lectures séquencées a révélé que le séquençage rdTotalRNA génère une proportion élevée de lectures issues de l'hôte (47-67 %), tandis que le dsRNAcD présentait un taux inférieur (21-65 %), permettant ainsi une meilleure identification des séquences virales (85-95 % contre 6-21 % pour rdTotalRNA). Le pipeline Cent&Rec a démontré une plus grande sensibilité pour la détection des virus, bien que le flux DIA&MEG soit également efficace après ajustement des seuils d'assignation taxonomique. L'étude a également mis en évidence des erreurs d'annotation dans la base ViroidDB, confirmant que le séquençage dsRNAcD est plus fiable que rdTotalRNA pour la détection des viroïdes. Globalement, ces résultats confirment l'intérêt du séquençage dsRNAcD par Nanopore comme une alternative performante aux méthodes conventionnelles pour la surveillance virologique en viticulture.

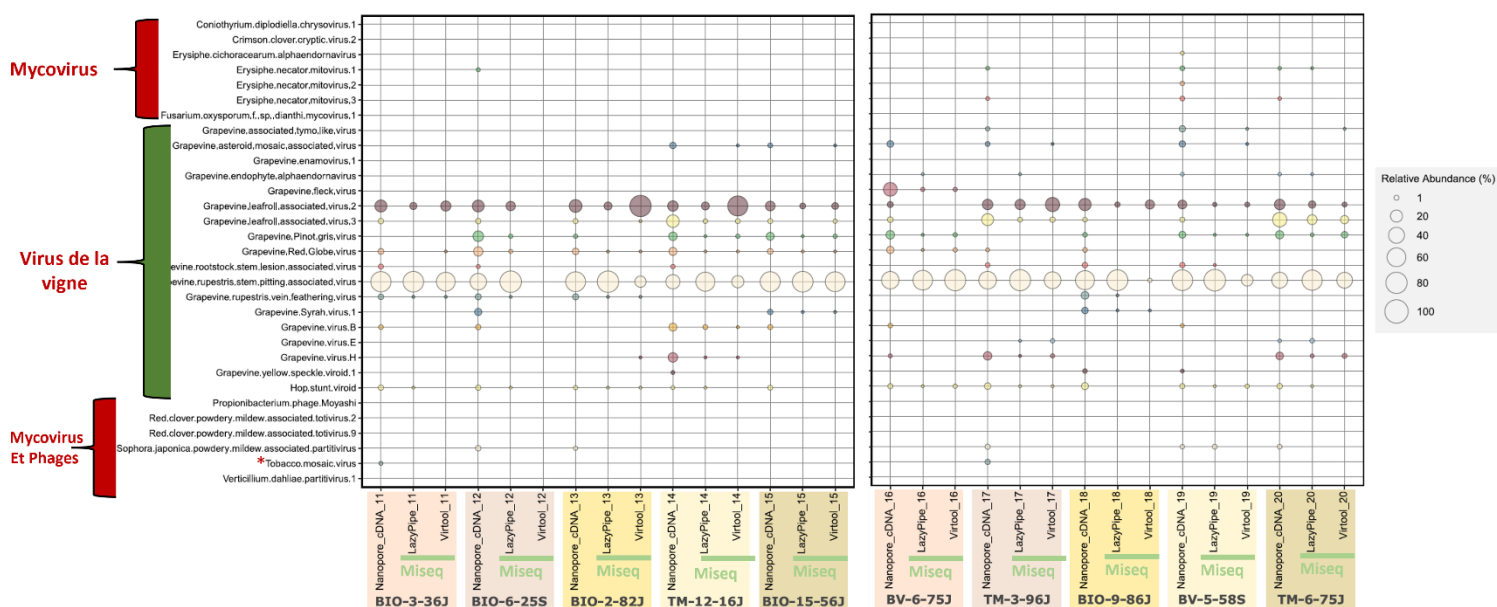


Figure 2. Comparaison des résultats du séquençage Nanopore et du séquençage Miseq pour la détection des virus de la vigne. Pour le séquençage direct d'ADNc et le séquençage Miseq, deux bibliothèques différentes ont été préparées après extraction d'DsRNA à partir d'échantillons infectés.

Tableau 2. Coût de séquençage de cDNA issu de l'extraction d'ARN doubles brins.

Étape principale	Étapes	Amorces aléatoires + codes-barres commerciaux			Codes-barres personnalisés		
		Matériel	1 Échantillon	23 Échantillons	Matériel	24 Échantillons (Custom-Barcodes)	96 Échantillons (Custom-Barcodes)
Synthèse du double brin d'ADNc	Premier brin	Mélange d'amorces aléatoires	2,7 \$	62,1 \$	Amorce personnalisée	2,9 \$	11,5 \$
		dNTPs	42 centimes	9,66 \$	dNTPs	10 \$	40,3 \$
		Inhibiteur de ribonucléase RNasin®	2,8 \$	64,4 \$	Inhibiteur de ribonucléase RNasin®	67,2 \$	269 \$
		Maxima H minus	5 \$	115 \$	Amorce de commutation de brin	20,4 \$	82 \$
					Maxima H minus	120 \$	480 \$
	Deuxième brin	RNase H	1,5 \$	34,5 \$	Enzyme RNase Cocktail™	43,2 \$	172,8 \$
					Point clé : Après cette étape, les échantillons seront regroupés.		
		dNTPs	42 centimes	9,66 \$	Amorce PR2	85 centimes	85 centimes
		Klenow	1,7 \$	39 \$	2x LongAmp Taq Master Mix	2 \$	2 \$
		E. coli DNA Ligase	3,74 \$	86 \$			
Préparation de la bibliothèque	Préparation finale	NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module	20 \$	460 \$	-	20 \$	20 \$
		Code-barres natif	-	190 \$	-	-	-

	Ligation de codes-barres	Blunt/TA Ligase Master Mix	-	271,5 \$	-	-	-
		Point clé : Après cette étape, les échantillons seront regroupés.					
	Ligation de l'adaptateur	NEBNext® Quick Ligation Module	38 \$	38 \$	-	38 \$	38 \$
Séquençage	Amorçage et chargement sur flow cell	Flow cell	900 \$	900 \$	-	900 \$	900 \$
		Kit produits chimiques	100 \$	100 \$	-	100 \$	100 \$
		Coût total/séquençage	1 077 \$	2 380 \$	-	1 324 \$	2 116 \$
		Prix total/échantillon	1 077 \$	103 \$	-	55 \$	22 \$



IMPACTS ET RETOMBÉES DU PROJET

Ce projet apporte des avancées majeures pour le Laboratoire d'Expertise et de Diagnostic en Phytoprotection (LEDP) en renforçant ses capacités en détection et surveillance des virus grâce à l'optimisation des méthodes d'extraction d'ARN et à l'intégration du séquençage nanopore. Le pipeline bio-informatique développé permettra d'améliorer l'efficacité des analyses en routine, facilitant une identification rapide et précise des virus. Les connaissances générées sur la diversité des viromes, les interactions virus-hôte et les facteurs environnementaux influençant l'expression des symptômes contribueront à une gestion plus proactive des maladies virales au Québec. De plus, l'étude des réponses physiologiques et métabolomiques des plants infectés offrira des outils innovants pour évaluer la tolérance variétale et adapter les stratégies de lutte. En intégrant ces avancées aux pratiques de surveillance et de diagnostic, le projet renforce la résilience du secteur viticole québécois face aux menaces virales et soutient le développement de mesures phytosanitaires plus

DÉBUT ET FIN DU PROJET :

2020-01-01 AU 2024-12-01

POUR INFORMATION

Dr Mamadou L. Fall, AAC,
Saint-Jean-sur-Richelieu,
Qc, Canada.

Mamadoulamine.fall@agr.gc.ca

Dr Peter Moffett,
Université Sherbrooke
Peter.moffett@usherbrook