

## Recommandation de la CMP: Les technologies de séquençage à haut débit (SHD) comme outil diagnostique à usage phytosanitaire

### État d'avancement du document

Cet encadré ne fait pas officiellement partie de la recommandation de la CMP et il sera modifié par le Secrétariat de la CIPV après l'adoption.	
<b>Date du présent document</b>	2018-12-06
<b>Catégorie du document</b>	Projet de recommandation de la CMP
<b>Étape actuelle du document</b>	À l'intention de la CMP à sa quatorzième session (2019)
<b>Principales étapes</b>	<p>2018-03 Proposition d'ajout du thème <i>Les technologies de séquençage nouvelle génération comme outil diagnostique à des fins phytosanitaires</i> au programme de travail de la CIPV visant l'élaboration d'une <i>recommandation de la CMP</i> formulée par l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'OEPP.</p> <p>2018-04 À sa treizième session, la CMP ajoute le thème au programme de travail visant l'élaboration d'une recommandation de la CMP.</p> <p>2018-05 Le projet est modifié à la suite de la treizième session de la CMP.</p> <p>2018-05 Consultation (15 mai-15 août 2018).</p> <p>2018-09 Le projet est révisé à la suite de la période de consultation.</p> <p>2018-10 Bureau de la CMP.</p> <p>2018-12 Bureau de la CMP.</p>
<b>Notes</b>	<p>Le présent document est un projet de texte présenté en anglais uniquement pendant la période de consultation.</p> <p>2018-08 Le titre est modifié suite à la consultation («séquençage nouvelle génération» remplacé par «séquençage à haut débit (SHD)»).</p> <p>2018-10 Révision éditoriale.</p> <p>2018-12 Révision éditoriale (partielle).</p>

### CONTEXTE

La Commission des mesures phytosanitaires (CMP) reconnaît que la certification des exportations, les inspections des importations et l'application des traitements phytosanitaires appropriés doivent s'appuyer sur un diagnostic des organismes nuisibles précis et effectué en temps utile<sup>1</sup>. Il est couramment admis que la capacité de détecter et d'identifier un organisme nuisible infectant une plante dépend de la précision, de la reproductibilité et de la spécificité des outils de détection.

Les technologies faisant appel au séquençage à haut débit (SHD), également appelé séquençage nouvelle génération (SNG) ou séquençage profond, constituent un nouvel outil puissant pouvant se substituer aux méthodes diagnostiques classiques pour détecter et identifier les organismes (bactéries, champignons, phytoplasmes, virus et viroïdes, par exemple). Cependant, un diagnostic faisant appel au SHD peut donner des résultats qui ne coïncident pas avec un quelconque indice de présence avérée

---

<sup>1</sup> Voir aussi la recommandation de la CMP R-07: L'importance de la diagnose des organismes nuisibles (<https://www.ippc.int/fr/publications/84234/>).

d'organisme nuisible vivant ni de détérioration de végétaux ou de produits végétaux par celui-ci. Ainsi, il convient d'interpréter avec prudence les résultats obtenus avec des technologies extrêmement sensibles telles que le SHD quand elles sont utilisées pour la détection et l'identification d'organismes nuisibles. En particulier, les risques et les conséquences liés à l'utilisation d'un diagnostic obtenu par SHD devraient être examinés soigneusement à l'heure de mettre en œuvre des mesures phytosanitaires. D'autre part, les technologies de SHD peuvent ne pas convenir à certaines organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV) en raison du coût élevé des dispositifs et des autres coûts opérationnels. Il convient par ailleurs de noter que chaque ONPV peut employer un dispositif de SHD différent.

De plus amples informations sur les technologies de SHD sont présentées dans l'appendice 1.

## À L'INTENTION

Des parties contractantes et des organisations régionales de la protection des végétaux.

## RECOMMANDATIONS

La Commission prend acte qu'il y a actuellement des problèmes à régler et qu'il est nécessaire de continuer à travailler sur la question des technologies de SHD utilisées pour détecter et identifier des organismes nuisibles comme préalable à l'application de règles phytosanitaires à leur sujet. Il est nécessaire de compléter les conclusions relatives à un micro-organisme inconnu obtenues grâce au SHD par des analyses plus poussées pour prouver que ce micro-organisme pourrait être nuisible et pourrait être considéré comme organisme nuisible réglementé.

La Commission *préconise* que les parties contractantes qui proposent d'employer les technologies de SHD et leurs résultats pour étayer l'application de règles phytosanitaires particulières:

- a) *établissent* des directives sur les actions à mener quand un organisme inconnu (champignon, bactérie ou virus, par exemple) ou des organismes non viables sont détectés dans du matériel végétal;
- b) *s'assurent* que les infrastructures et investissements en matière d'informatique, de bio-informatique ainsi que d'éducation et formation sur la bio-informatique nécessaires à un stockage des données et à une interprétation des résultats d'essai adéquats sont en place et que ces technologies sont mises en œuvre efficacement;
- c) *normalisent* et *appliquent* des directives opérationnelles concernant les pratiques optimales en matière de SHD qui précisent comment interpréter correctement les résultats et indiquent les mesures de contrôle de la qualité adéquates (par exemple au moyen de contrôles des procédures) permettant de garantir la fiabilité et l'exactitude des résultats obtenus par SHD, ayant une importance biologique dans le contexte phytosanitaire et pouvant être mises en œuvre de manière harmonisée.
- d) *valident* la fiabilité et la précision du SHD au moyen d'essais comparatifs avec d'autres dispositifs diagnostiques existants;
- e) *communiquent* à l'ONPV du pays exportateur les informations relatives à l'interprétation des résultats du SHD, en particulier s'agissant des conclusions sur le risque phytosanitaire que présentent les organismes détectés;
- f) *mettent en œuvre* des programmes de formation sur le SHD comprenant des cours en ligne sur les pratiques optimales en laboratoire et *coordonnent* un examen international destiné à évaluer les capacités des laboratoires de façon indépendante;

- g) *publient* des protocoles de SHD (adaptés à chaque dispositif de SHD) et *mettent à disposition* les directives et les supports didactiques à des fins de transparence;
- h) *publient* des informations concernant les associations biologiques inattendues entre des organismes de quarantaine infestant des végétaux ou produits végétaux mises en lumière par le SHD.

**RECOMMANDATION(S) REMPLACÉE(S) PAR LA RECOMMANDATION  
CI-DESSUS**

Aucune.

Le présent appendice figure ici uniquement à titre de référence et ne constitue pas une partie prescriptive de la recommandation de la CMP.

## **APPENDICE 1**

### **Contexte**

En décembre 2017, le Bureau de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) a examiné un document rédigé par le Comité des normes (CN) faisant état des échanges au sein du Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (GTPD) les possibilités et les défis associés à l'utilisation des technologies de séquençage à haut débit (SHD) comme outil diagnostique à des fins phytosanitaires. Le Bureau a été invité à approuver la présentation du document d'information à la treizième session de la CMP et à appeler la Commission à prendre note des défis associés à l'utilisation des technologies de SHD ainsi que des travaux complémentaires qui s'imposent concernant l'emploi de ces technologies pour détecter et identifier les organismes nuisibles.

Le CN a élaboré un document sur l'utilisation des technologies de SHD comme outil diagnostique à des fins phytosanitaires à partir des échanges au sein du Groupe technique sur les protocoles de diagnostic portant sur les atouts et les problèmes que présentent ces technologies.

En décembre 2017, le Bureau de la CMP a été invité à approuver la présentation du document d'information à la treizième session de la CMP et à appeler la Commission à prendre note des problèmes liés à l'utilisation des technologies de SHD et à reconnaître que des travaux complémentaires sont nécessaires concernant l'emploi de ces technologies pour détecter et identifier des organismes nuisibles.

Le Bureau de la CMP est convenu que, s'agissant d'une question émergente susceptible d'intéresser les parties contractantes, une recommandation de la CMP devrait être rédigée afin de fournir des orientations et des conseils aux parties contractantes et aux organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) concernant le recours aux technologies de SHD comme outil diagnostique à des fins phytosanitaires.

À la treizième session de la Commission, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) ont présenté un projet de recommandation de la CMP et les participants sont convenus d'ajouter ce thème au programme de travail de la CIPV en vue de l'élaboration d'une recommandation de la CMP sur «les technologies de séquençage à haut débit comme outil diagnostique à usage phytosanitaire».

### **Qu'est-ce que le SHD et en quoi diffère-t-il des autres méthodes d'essai?**

Le séquençage à haut débit (SHD), également appelé séquençage nouvelle génération (SNG) ou séquençage profond, permet de séquencer l'intégralité du génome de tous types d'organismes, ce qui est particulièrement intéressant pour les organismes non cultivables (par exemple les virus et viroïdes ainsi que certains types de bactéries, oomycètes et champignons). Les technologies de SHD peuvent servir à la détection ciblée d'organismes nuisibles réglementés tout comme à détecter des organismes inconnus (c'est-à-dire sur lesquels il n'existe pas encore de données). Elles permettent de séquencer le matériel génétique et d'ainsi identifier le génome de micro-organismes qui présentent un intérêt sur le plan phytosanitaire mais qui n'ont pas encore été identifiés avec les technologies classiques. Ces technologies ont récemment abouti à la découverte de micro-organismes jamais détectés auparavant, notamment des champignons, des bactéries, des phytoplasmes et surtout des virus dont le dépistage exige des techniques plus élaborées que pour d'autres pathogènes (les exemples cités dans le présent document s'appliquent à des virus ou viroïdes). Dans la mesure où un grand nombre d'organismes restent à découvrir, les chercheurs et les diagnosticiens qui font appel aux technologies de SHD continueront à identifier et à décrire des organismes jusqu'alors inconnus, à propos desquels les organisations nationales de protection des végétaux (ONPV) devront rapidement prendre des décisions

déliçates compte tenu du peu d'information disponible et d'une évaluation imprécise des risques phytosanitaires potentiels (Olmos *et al.*, 2018). Ces technologies constituent donc un moyen nouveau et exhaustif de détecter et de caractériser les organismes potentiellement nuisibles présents dans un échantillon biologique.

Pour l'heure, les essais phytosanitaires visant à détecter les virus et les viroïdes présents dans les végétaux et les produits végétaux combinent des approches spécifiques (moléculaires et sérologiques) et des approches générales (inspection visuelle, examen au microscope électronique, indicateurs biologiques et bioessais). Bien que ces méthodes très répandues dans les laboratoires de diagnostic des organismes nuisibles soient les meilleures disponibles aujourd'hui, elles accusent plusieurs faiblesses intrinsèques. Dans le cas des essais spécifiques, il est généralement nécessaire d'avoir des connaissances préalables sur les pathogènes viraux, et il faut mettre au point et valider chaque essai (et ce pour les différentes combinaisons organisme nuisible/hôte), ce qui impose aux ONPV de disposer d'importantes ressources. De plus, ces essais spécifiques peuvent également permettre de détecter les traces d'acide nucléique ou de protéine produites par la désintégration de particules de pathogènes, ce qui peut conduire à surestimer la présence réelle d'agents pathogènes. La gamme de végétaux hôtes de nombreux pathogènes demeure mal connue, et il se peut que les virus ou les viroïdes exotiques ne soient pas détectés en cas de combinaison organisme nuisible/hôte inédite. Les bioessais sont normalement utilisés pour détecter les virus inconnus, mais il faut généralement les compléter par des analyses moléculaires ou sérologiques afin de confirmer l'identité de l'agent étiologique lorsque des symptômes sont observés. Les bioessais dépendent fortement des conditions environnementales, qui influencent l'expression des symptômes, si bien que ces essais aboutissent souvent à des résultats ambigus ou à de faux positifs ou faux négatifs.

En outre, du fait de la durée nécessaire aux bioessais, les végétaux passent de longues périodes en station de quarantaine post-entrée, ce qui alourdit considérablement les coûts et allonge les délais pour les importateurs. Les bioessais présentent encore un inconvénient: il arrive que les souches ne soient pas détectées si l'infection est asymptomatique sur l'hôte qui sert d'indicateur. Les études menées jusqu'à présent ont prouvé que le SHD est aussi au moins aussi performant que les essais d'indexation biologique s'agissant de détecter les virus et les viroïdes importants sur le plan agronomique (Barrero *et al.*, 2017; Mackie *et al.*, 2017; Rott *et al.*, 2017; Rwahnih *et al.*, 2015). Il en ressort principalement que le SHD peut livrer des résultats nettement plus rapidement que les bioessais. Cela étant, les technologies de SHD sont employées en complément d'autres essais et ne dispensent pas de confirmer l'importance biologique de l'organisme détecté.

Du fait des limites des méthodes de diagnostic classiques, de nouvelles méthodes éprouvées, fiables et peu coûteuses sont nécessaires pour le dépistage rapide et fiable des virus et des viroïdes dans les végétaux et les produits végétaux, mais aussi d'autres organismes nuisibles non cultivables et particulièrement difficiles à isoler, ce que permettent justement les technologies de SHD. Le codage à barres d'un large spectre d'ADN (aussi appelé métabarcoding), qui consiste à détecter par SHD des amplicons de PCR (amplification en chaîne par polymérase) correspondant chacun à une région de l'ADN définie comme code-barres d'un organisme, peut servir comme outil diagnostique à des fins phytosanitaires. Ces méthodes qui font appel au SHD sont celles qui pourraient avoir le plus de chances d'avoir une application diagnostique, y compris pour les organismes nuisibles autres que des virus.

Dans le cadre de diagnostics de routine, les technologies de SHD ouvrent les possibilités suivantes: 1) comprendre la situation d'un organisme nuisible dans une région grâce à des programmes de surveillance, 2) certifier le matériel de départ entreposé en conservatoire et le matériel de propagation végétale, 3) réaliser les essais de quarantaine (post-entrée) et 4) assurer le suivi des marchandises importées pour déterminer les nouveaux risques phytosanitaires potentiels y afférents. Le SHD offre un grand nombre d'avantages pour toutes ces applications (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Hadidi *et al.*, 2016; Rott *et al.*, 2017). La mise en œuvre de ces technologies pose toutefois des difficultés, en raison

notamment des exigences connexes en matière d'infrastructure, de bioinformatique, de partage et de validation des données (Olmos *et al.*, 2018).

### **Problèmes réglementaires et scientifiques**

L'avènement de nouvelles technologies s'accompagne de problèmes inhérents à chacune de celles-ci. Les technologies de SHD posent des difficultés similaires à celles d'autres méthodes fondées sur la détection de molécules ou de séquences d'ADN. Quoi qu'il en soit, les avancées qu'on leur doit ont des conséquences importantes sur le plan phytosanitaire. À titre d'exemple, les déplacements de matériel végétal risquent d'être limités après la détection d'un micro-organisme (jusqu'alors inconnu) qui n'est pas forcément pathogénique pour le matériel végétal concerné. Les organismes associés à des végétaux ne sont pas tous nuisibles et peuvent faire partie du microbiome de ceux-ci; certains d'entre eux peuvent y entretenir des interactions mutualistes, c'est-à-dire favorables au végétal hôte, ou commensales. L'assurance que les décisions prises ne visent que des organismes nuisibles – et pas des organismes mutualistes ni commensaux – est un critère essentiel dans le choix d'adopter ou non le séquençage du génome complet comme méthode diagnostique. Par ailleurs, les technologies de SHD peuvent avoir l'inconvénient, comme d'autres méthodes indirectes, de détecter des organismes non viables.

Il y a deux difficultés distinctes, mais également importantes, avec ces technologies: identifier précisément, à partir de séquences du génome entier, les organismes nuisibles ou en prévoir la présence. L'interprétation correcte des résultats est un autre défi majeur de l'utilisation du SHD. Il faudra disposer de bases de données très fournies et bien gérées regroupant le génome entier ou des codes-barres ADN des organismes nuisibles et des micro-organismes connus à titre de référence pour les comparer aux résultats obtenus par SHD. Compte tenu que de nouveaux micro-organismes sont découverts à un rythme de plus en plus rapide, les ONPV seront confrontées à une tâche délicate: prendre des décisions relatives à l'importance biologique d'une découverte – par exemple la capacité d'un micro-organisme d'infester des végétaux ou des produits végétaux – sur la base d'analyses de données de séquençage d'acide nucléique, sans toutefois disposer d'informations complètes, voire sans la moindre information. Ce processus décisionnel vise à déterminer si un organisme est nuisible, mais il établit des diagnostics sans analyser la pathogénicité, si bien qu'on peut se demander si les données traduisent la présence effective d'une entité biologique viable et pathogénique pouvant être considérée comme un organisme de quarantaine. Cela étant, le problème n'est pas nouveau: les mêmes difficultés se posent avec les méthodes de séquençage moléculaire et avec les méthodes de séquençage de première génération, en particulier dans le cas de virus encore inconnus. Martin *et al.* (2016), Massart *et al.* (2017) et Olmos *et al.* (2018) ont souligné d'autres défis liés à l'utilisation du SHD à des fins réglementaires.

Pour que les ONPV se fient aux technologies de SHD pour le diagnostic d'organismes nuisibles, il convient d'adopter des approches harmonisées au plan international, en élaborant notamment des directives opérationnelles qui permettent de réaliser des SHD de manière fiable et répétable et prévoient des contrôles de la qualité et des données de validation pour interpréter les résultats du SHD (Boonham *et al.*, 2014). Il est également nécessaire de valider ces technologies en regard des méthodes existantes, en tenant compte des limites des procédures actuelles. Il faut que les technologies de SHD soient validées minutieusement pour chaque organisme nuisible ciblé et chaque matrice afin de démontrer qu'elles sont bien appropriées. Il faudrait que des protocoles de laboratoire soient mis à disposition et indiquent la méthode de préparation des échantillons, le processus d'analyse des données et les bases de données à exploiter.

### **Collaboration mondiale**

Plusieurs initiatives sont en cours dans différentes régions du monde pour étudier l'exploitation des technologies de SHD comme outil diagnostique à usage phytosanitaire (par exemple en Australasie, en Europe et en Amérique du Nord), et visent notamment à examiner les politiques qui pourraient être élaborées en lien avec ces technologies. Il est impératif de coordonner ces initiatives afin de progresser

rapidement dans l'élaboration de normes internationales harmonisées encadrant l'utilisation du SHD à des fins réglementaires.

## Références

- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C., et Rowhani, A.** 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology*, 105(6): 758-763.
- Barrero, R. A., Napier, K. R., Cunnington, J., Liefiting, L., Keenan, S., Frampton, R. A., Szabo, T., et al.** 2017. An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinformatics*, 18: 26.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., et Mumford, R.** 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186: 20-31.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., et Barba, M.** 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325.
- Mackie, J., Liefiting, L., Barrero, R. A., Dinsdale, A., Napier, K. R., Blouin, A. G., Woodward, L., et al.** 2017. Comparative diagnosis of viral pathogens using side-by-side trials of existing post entry quarantine and small RNA next generation sequencing methods. Résumé, Plant Biosecurity Cooperative Research Centre, conférence sur le thème «Science Protecting Plant Health», 23-28 septembre 2017, Brisbane (Australie). Disponible à l'adresse <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017> (dernière consultation le 21 octobre 2018).
- Martin, R. R., Constable, F., et Tzanetakis, I. E.** 2016. Quarantine regulations and the impact of modern detection methods. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 189-205.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.-S., et al.** 2017. A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8: 45.
- Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D., Liefiting, L., et al.** 2018. High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities. *Bulletin de l'OEPP n° 48*: 219-224.
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., et al.** 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Disease*, 101: 1489-1499.