

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/ LSV/ MA047 – Version 2

Septembre 2018

Détection de *Plenodomus tracheiphilus* par la technique de PCR en temps réel

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons sur toutes matrices »



Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1		Février 2018	Version initiale
v2	Majeure	Août 2018	Correction des séquences des oligonucléotides sens et antisens ciblant des régions spécifiques du génome de <i>P. tracheiphilus</i> . Précisions concernant les étapes d'extraction d'ADN

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 25 octobre 2017 au 25 novembre 2017 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS 40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été optimisée et évaluée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux, d'après les travaux de Demontis *et al.* (2008).

Le travail de relecture a été effectué par l'unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN	9
5.3 Oligonucléotides	9
5.4 Kit d'amplification pour PCR en temps réel.....	9
5.5 Autres consommables à usage unique	10
5.6 Contrôles et témoins.....	10
6. Appareillage et matériels	11
7. Échantillons	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	13
8. Mode opératoire	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	14
8.3 Test de détection par PCR en temps réel	14
9. Résultats	16
9.1 Contrôle de la validité des résultats	16
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10. Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe 1 : symptômes de <i>P. tracheiphilus</i> sur <i>Citrus</i> sp.	21
Annexe 2 : schéma décisionnel	22
Bibliographie	23



Introduction

Plenodomus tracheiphilus (Petri) Gruyter, Aveskamp & Verkley (ex. *Phoma tracheiphila*) est un champignon phytopathogène agent du « mal secco » des agrumes. Cette maladie vasculaire est responsable d'importants dépérissements sur citronnier (*Citrus ×limon*), mais de nombreuses espèces de *Citrus*, d'autres genres d'agrumes (p.ex. *Fortunella*, *Poncirus*) ainsi que leurs hybrides peuvent également être affectés.

La distribution de *P. tracheiphilus* est principalement localisée dans les pays du bassin méditerranéen et de la Mer Noire.

Les premiers symptômes apparaissent (au printemps) sous la forme d'une chlorose des feuilles et des pousses suivie d'un dépérissement des rameaux et des branches. Des zones de rameaux contaminés prennent une coloration gris-cendré avec le développement de fructifications du pathogène. Une réaction fréquente de l'arbre consiste en la production de nouvelles pousses à la base de branches flétries ou de rejets à partir du porte-greffe. Progressivement, le pathogène contamine l'arbre entier qui peut dépérir.

Une coloration caractéristique, beige à beige-saumon ou orangée, parfois brunâtre, est visible dans les tissus du bois après élimination de l'écorce ou en coupe transversale.

Deux autres formes moins répandues de la maladie, citées dans la bibliographie, sont vraisemblablement dues à des infections racinaires. Le « mal nero » induit un brunissement du bois de cœur et le « mal fulminante » un dépérissement rapide et létal.

La dissémination se produit généralement via l'eau (pluie, eau d'irrigation, éclaboussures,...), et éventuellement via des outils contaminés. Le champignon s'installe sur les tissus hôtes (parties aériennes ou racines) à la faveur de blessures pouvant être causées par certaines pratiques culturales (p.ex. taille,...), des conditions climatiques difficiles (p.ex. tempête, grêle, gel,...) ou d'autres organismes.

Cet agent pathogène est un parasite réglementé par l'Union Européenne. A ce titre, il est listé dans l'annexe II A II de la Directive 2000/29/EC du Conseil sous la taxonomie de *Phoma tracheiphila* (Petri) Kantschaveli et Gikaschvili.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à possible dissémination aérienne doit être de type NS3.

Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des solutions d'ADN (S_{ADN}) peuvent être éliminés sans traitement particulier.



1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Plenodomus tracheiphilus* dans des tissus végétaux. La présence de *P. tracheiphilus* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. tracheiphilus* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *P. tracheiphilus* ou contaminés à un niveau trop faible pour pouvoir être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode concerne les plants et sujets adultes de *Citrus* spp., *Fortunella* spp. et *Poncirus* spp. ainsi que leurs hybrides (cf. Directive UE 2000/29). Néanmoins, selon l'évolution des connaissances scientifiques concernant ce parasite, cette méthode reste utilisable sur d'autres plantes si la gamme d'hôtes potentiels ou avérés venait à s'élargir (p.ex. genre *Severinia* d'après Demontis *et al.*, 2008). Les paramètres de validation de l'analyse seraient toutefois à adapter (p.ex. Ct seuil 18S).

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été validée sur des tissus lignifiés de *Citrus* spp. présentant des symptômes (p.ex. rameaux, sections de branches). Les échantillons soumis à l'analyse seront ainsi constitués de tissus lignifiés symptomatiques (p.ex. rameaux chlorotiques, en cours de dépérissement ou de nécrose; présentant une coloration du bois localisée plus ou moins profondément dans ce dernier et plus ou moins étendue), cf. § Introduction' et Annexe 1.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : Sans objet.

2. Documents de référence

- [1] **MOA 022** : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

3. Termes, sigles et définitions

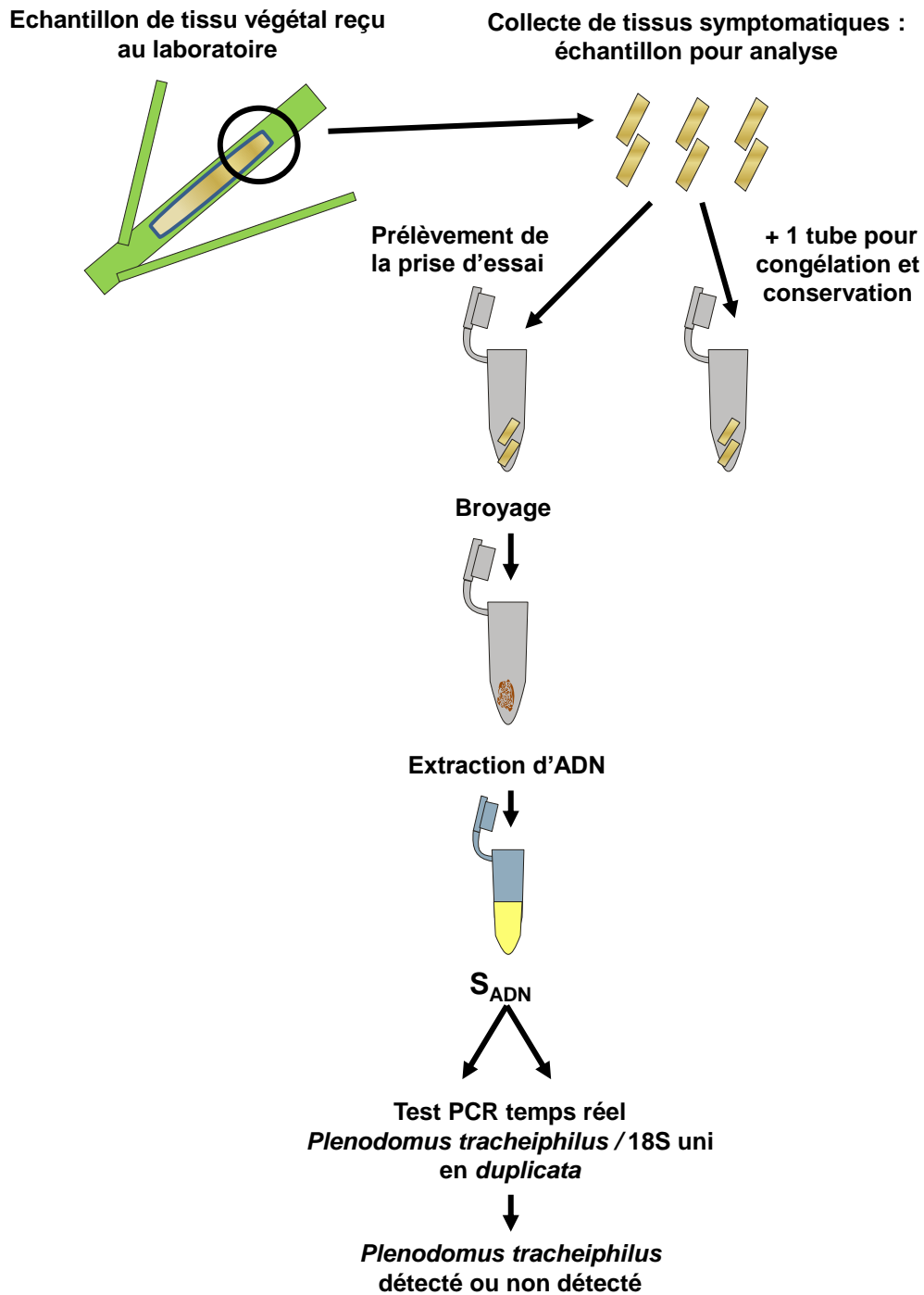
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-après :





5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Les kits d'extraction initialement validés pour cette méthode sont le Nucleospin Plant II® (Macherey Nagel) et le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), (cf. dossier LNR de validation de la méthode MIAM 006).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce sonde	ou Séquence (5'-3')
<i>P. tracheiphilus</i>	PhomaFor-F ^a	GCT GCG TCT GTC TCT TCT GA
	PhomaRev-R ^a	GTG TCC TAC AGG CAG GCA A
	PhomaProbe-P ^a	[FAM]-CCA CCA AGG AAA CAA AGG GTG CG -[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^b	GCA AGG CTG AAA CTT AAA GGA A
	18S uni-R ^b	CCA CCA CCC ATA GAA TCA AGA
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACG GAA GGG CAC CAC CAG GAG T -[BHQ1]

^a (Demontis *et al.*, 2008), ^b (loos *et al.*, 2009)

Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.4 Kit d'amplification pour PCR en temps réel



Le kit d'amplification initialement validé pour cette méthode est le qPCR™ Mastermix - No Rox (Eurogentec) (cf. dossier LNR de validation de la méthode MIAM 006).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microtubes de Lysing Matrix A de 2 mL (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente (cf. dossier LNR de validation de la méthode MIAM006). Le tube de Lysing Matrix A contient du sable de grenat et une bille de céramique stériles qui permettent de broyer la prise d'essai lorsque agité.
- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR en temps réel de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel est associée à l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont à *minima* les suivants :

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai. Il prendra la forme d'un test PCR en temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le parasite cible ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection de *P. tracheiphilus* (test en duplex). En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (tissus végétatifs de *Citrus*) dans ses propres



conditions. Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni, sur tissu de rameau de *Citrus sp.*, a été déterminée à 19.8 (Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 006).

- Un témoin négatif de processus (T_{-PROC}) ou un témoin négatif d'extraction (T_{-extr.}) sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "T_{-extr.}"), c'est à dire un microtube vide de Lysing Matrix A de 2 ml stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN. Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon de tissus de *Citrus* reconnu non contaminé par *P. tracheiphilus* (témoin négatif de processus, T_{-PROC}). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
- Un témoin positif (T_{+18S Citrus}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T_{+18S Citrus} est constitué d'une solution d'ADN génomique extraite de tissus lignifiés de *Citrus sp.* (concentration finale comprise entre 3 et 5 ng/μL).
- Un témoin positif en limite pratique de détection (T_{+LOD}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *P. tracheiphilus* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *P. tracheiphilus* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T_{+LOD} peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.
- Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control) sera systématiquement introduit en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des S_{ADN} dans les tubes individuels de PCR.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires, que le laboratoire peut ajouter si nécessaire, sont définis par la MOA 022.

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces



informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$

**Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.*

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été initialement développée et validée sur un appareil Rotorgene 6000, Corbett Research.
- Broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :



Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : Les échantillons sont constitués de tissus lignifiés (p.ex. rameaux) présentant des symptômes (cf. 'Introduction' et Annexe 1). Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis : Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis dans les cas où l'échantillon doit être pris en charge dans des conditions confinées.

Fiche de demande d'analyse : formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 60 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. La prise d'essai s'effectuera sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *P. tracheiphilus* ou éventuellement des symptômes douteux.

Les prélèvements de tissus s'effectuent dans ou en limite de la zone nécrosée ou colorée en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions les plus



pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite. (Cf. 'Introduction' et Annexe 1)

Les fragments de tissus sont ensuite découpés, à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée, en tronçons les plus petits possible (si possible ≤ 2 à 3 mm d'arête). Ces fragments sont ensuite mélangés puis transférés dans un microtube de 2 ml (lysing matrix A) en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ un tiers du tube. À cette étape, un tube supplémentaire de fragments est préparé. Ce dernier sera identifié et conservé congelé, afin de disposer de matériel en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons, jusqu'à la phase de broyage. Il subira ensuite toutes les étapes de l'extraction de la même façon que les échantillons.
2. **Avant ouverture du microtube de Lysing Matrix A contenant la prise d'essai,** centrifuger brièvement le microtube afin de précipiter toutes les particules constituant l'échantillon au fond de celui-ci et débarrasser les capuchons de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage d'ADN au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 1 minute à une fréquence de 6,5 unités (m/s). Recommencer cette étape une deuxième fois.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre le broyat au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube entre, environ, 15 et 20 minutes à environ 65°C (ou à la température préconisée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN (si nécessaire ou approprié, penser à brièvement centrifuger les tubes afin de limiter les risques de projections à leur ouverture).
8. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total est élué dans un volume final de 100 μ L de tampon d'élué. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe

Le volume réactionnel est 25 μ l : 23 μ l de mélange réactionnel et 2 μ l de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :



Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 23 μ l
qPCR mastermix No ROX (Eurogentec)	1 X
Amorce sens PhomaFor	0.2 μ M
Amorce antisens PhomaRev	0.2 μ M
Sonde PhomaProbe	0.1 μ M
Amorce sens 18S uni-F	0.3 μ M
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 μ M
Sonde 18S uni-P	0.1 μ M

1. Le mélange réactionnel se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL.
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Le microtube contenant le mélange réactionnel complet doit être passé au vortex pendant 5 à 10 secondes environ, avant sa distribution.
5. Le mélange réactionnel est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 23 μ L par microtube.

Addition des solutions d'ADN (S_{ADN}) à tester dans les microtubes de PCR

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 μ L par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testées en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T-, on substitue à la S_{ADN} 2 μ l d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *P. tracheiphilus* sont les suivants (Demontis *et al.*, 2008) :



Etape	Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1 Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C*	5 min *	1
2 Dénaturation	95°C	30 sec *	
3 Hybridation - polymérisation	60°C	30 sec puis mesure de la fluorescence FAM et	40
4 polymérisation	72°C	30 sec	

* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

À la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni en fin de réaction :

- Aucun des réplicats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.
- Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.
- Les réplicats de T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *P. tracheiphilus*.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.



9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN} , donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct du contrôle T_{+LOD} ($=Ct_{LOD}$). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs.

- Si les deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai, sont positifs pour le test PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe, la prise d'essai considérée est dite positive pour *P. tracheiphilus*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « ***P. tracheiphilus* détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-écrite.
- Si un seul réplicat de S_{ADN} parmi les deux de la prise d'essai, est positif pour le test PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe, refaire un test PCR PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe en *duplicata* (le résultat de ce nouveau test sera analysé comme un nouvel extrait). Si le même résultat est obtenu, contacter le LNR.
- Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe et que la S_{ADN} de la prise d'essai est positive pour le test 18S uni (voir §5.6), l'échantillon considéré est dit négatif pour *P. tracheiphilus*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « ***P. tracheiphilus* non détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode.
- Si aucun des réplicats de la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test PhomaFor/ PhomaRev/ PhomaProbe et que cette S_{ADN} est aussi négative pour le test 18S uni, la prise d'essai est dite « non utilisable » pour la recherche de *P. tracheiphilus*. Ce cas de figure traduit i) une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN} ou ii) une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée. Une dilution au dixième de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Les résultats obtenus sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux sur les solutions pures. Si le même résultat est à nouveau obtenu, il faudra vérifier qu'une quantité suffisante d'ADN a été extraite pour chacune des prises d'essai par dosage au spectrophotomètre ou par électrophorèse sur gel par comparaison avec ce qui est obtenu avec des échantillons de même type. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée et une nouvelle prise d'essai sera réalisée si la taille de l'échantillon le permet. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé et si une nouvelle prise d'essai n'est pas possible, le résultat sera alors exprimé par « **résultat indéterminé** » selon la méthode ci-décrite, et il conviendra de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

Le diagramme décisionnel présenté en annexe 2 résume ces conditions.



10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraites du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MIAM006.

Pour l'évaluation des critères de performance, le Mastermix No Rox (Eurogentec) a été utilisé au cours des différentes réactions de PCR en temps réel réalisées.

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<p>L'efficacité de la réaction a été estimée à 82,1% en duplex avec une gamme de dilutions de molécules cibles, préparée dans de la matrice d'ADNg de tissus lignifiés de <i>Citrus</i>.</p> <p>0,9939 correspond à la valeur estimée pour le R^2.</p>
Sensibilité analytique	<p>La sensibilité analytique a été estimée à 482 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR pour une réaction en duplex (<i>P. tracheiphilus</i> / 18S uni) pour des dilutions dans de la matrice d'ADNg de tissus lignifiés de <i>Citrus</i>.</p> <p>La sensibilité du test pour des dilutions préparées dans de l'eau ultra-pure a été estimée à 48,2 cp d'ADN cible par tube de PCR pour une réaction en duplex. Cette concentration servira de contrôle réactionnel en limite de détection du test (T_{+LOD}) lors des analyses.</p>
Spécificité analytique	<p>La spécificité a été évaluée <i>in silico</i> par BLAST des séquences des amorces et de la sonde du test (données GenBank). Le résultat du BLAST montre que les séquences présentant un niveau d'homologie égal à 100% appartiennent aux isolats de la cible <i>P. tracheiphilus</i> mais également à un isolat d'une espèce non cible, c.-à-d. <i>Plenodomus chrysanthemi</i> (ex. <i>Phoma vasinfecta</i>). Il n'existe pas de polymorphisme dans la zone cible amplifiée par les amorces.</p> <p>Bien qu'une réaction croisée avec <i>Plenodomus chrysanthemi</i> ne puisse être totalement exclue au cours du test, celle-ci s'avère peu probable. En effet :</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>P. chrysanthemi</i> (ex. <i>Phoma vasinfecta</i>) est une espèce hôte-spécifique qui s'installe sur des plantes différentes appartenant au genre <i>Chrysanthemum</i> ;- d'après Baker <i>et al.</i> (1985), aucune infection ne se développe à la suite de tests d'inoculation de plants de <i>Citrus limon</i> et de plantules de <i>Citrus aurantium</i> par <i>P. chrysanthemi</i> ;- le test utilisé dans ce protocole s'applique sur des tissus de <i>Citrus</i> spp. ou d'agrumes présentant des symptômes. <p>De plus, la spécificité a pu être démontrée <i>in vitro</i> sur une gamme de 12 espèces de <i>Phoma</i> ou <i>Plenodomus</i> (12 isolats) et de 11 espèces de champignons isolés à partir de tissus de <i>Citrus</i> spp. (14 isolats), incluant ainsi des espèces proches génétiquement et d'autres présentes dans la même niche écologique.</p> <p>Ainsi, lorsque l'analyse est réalisée sur des tissus symptomatiques de <i>Citrus</i> (ou d'autres genres requis par la méthode), le test évalué peut être considéré comme spécifique.</p>



Inclusivité	L'inclusivité a été démontrée <i>in silico</i> par BLAST des séquences des amorces et de la sonde du test (données GenBank), et <i>in vitro</i> par test PCR temps réel sur des extraits d'ADNg de 24 isolats de <i>P. tracheiphilus</i> d'origines diverses et isolés à partir de différents agrumes. Le test cible 100% des souches/séquences d'organismes cibles testées.																																											
Répétabilité et reproductibilité	<table border="1" data-bbox="352 577 1337 996"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cible</th> <th rowspan="2">Diluant</th> <th rowspan="2">Concentration de cible (cp/μL)</th> <th rowspan="2">Résultat qualitatif</th> <th colspan="2">Coefficient de Variation des Ct (%)</th> </tr> <tr> <th>intra run (répétabilité)</th> <th>inter run (reproductibilité)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">ADN plasmidique</td> <td rowspan="3">Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.</td> <td>2,41x10⁵</td> <td>+</td> <td>0,96</td> <td>5,94</td> </tr> <tr> <td>2,41x10⁴</td> <td>+</td> <td>0,43</td> <td>4,21</td> </tr> <tr> <td>2,41x10³</td> <td>+</td> <td>1,83</td> <td>2,39</td> </tr> <tr> <td>ADN génomique</td> <td>Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.</td> <td>n.d.*</td> <td>+</td> <td>0,48</td> <td>5,02</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="352 1012 1043 1041">* n.d. : non déterminé, ADNg d'un échantillon naturellement contaminé</p> <p data-bbox="352 1115 1158 1144">La répétabilité et la reproductibilité qualitatives du test sont égales à 100%.</p>					Cible	Diluant	Concentration de cible (cp/μL)	Résultat qualitatif	Coefficient de Variation des Ct (%)		intra run (répétabilité)	inter run (reproductibilité)	ADN plasmidique	Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.	2,41x10 ⁵	+	0,96	5,94	2,41x10 ⁴	+	0,43	4,21	2,41x10 ³	+	1,83	2,39	ADN génomique	Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.	n.d.*	+	0,48	5,02											
Cible	Diluant	Concentration de cible (cp/μL)	Résultat qualitatif	Coefficient de Variation des Ct (%)																																								
				intra run (répétabilité)	inter run (reproductibilité)																																							
ADN plasmidique	Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.	2,41x10 ⁵	+	0,96	5,94																																							
		2,41x10 ⁴	+	0,43	4,21																																							
		2,41x10 ³	+	1,83	2,39																																							
ADN génomique	Extrait d'ADN de tissus lignifiés de <i>Citrus</i> sp.	n.d.*	+	0,48	5,02																																							
Robustesse	<p data-bbox="352 1205 1433 1330">Les différentes variations des paramètres expérimentaux testés (cf. ci-dessous) n'ont pas affecté les résultats qualitatifs, tous conformes aux résultats attendus : pas de perte de spécificité (absence de réaction croisée), effets limités sur les valeurs des moyennes de Ct pour les échantillons cibles, tous détectés positifs.</p> <ul data-bbox="352 1435 1426 1491" style="list-style-type: none"> • Tableau présentant les résultats de la robustesse de la sensibilité à des concentrations proches de la limite de détection (variation de volume réactionnel et du volume d'ADN matrice) <table border="1" data-bbox="352 1541 1337 2047"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Paramètres</th> <th rowspan="2">Variables testées</th> <th colspan="2">Ct moyen (±ET) ^{&}</th> <th rowspan="2">Ct moyen (±ET) ^{&}</th> </tr> <tr> <th colspan="2">ADN plasmidique (cp/μL)</th> <th>ADN génomique *</th> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <th>2,41x10⁴</th> <th>2,41x10³</th> <td></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">Volume de mix réactionnel</td> <td>20,5 μL</td> <td>23,72 ± 0,19 ^a</td> <td>28,21 ± 0,19 ^b</td> <td>20,18 ± 0,16 ^{a b}</td> </tr> <tr> <td>23 μL [#]</td> <td>23,84 ± 0,12 ^a</td> <td>27,77 ± 0,23 ^a</td> <td>20,12 ± 0,09 ^a</td> </tr> <tr> <td>25,5 μL</td> <td>23,79 ± 0,13 ^a</td> <td>27,58 ± 0,14 ^a</td> <td>20,29 ± 0,15 ^b</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Volume d'ADN template</td> <td>1,8 μL</td> <td>23,73 ± 0,25 ^a</td> <td>27,75 ± 0,08 ^a</td> <td>19,93 ± 0,08 ^a</td> </tr> <tr> <td>2 μL [#]</td> <td>23,84 ± 0,12 ^a</td> <td>27,77 ± 0,23 ^a</td> <td>20,12 ± 0,09 ^b</td> </tr> <tr> <td>2,2 μL</td> <td>24,12 ± 0,15 ^a</td> <td>28,16 ± 0,18 ^b</td> <td>19,93 ± 0,15 ^a</td> </tr> </tbody> </table>					Paramètres	Variables testées	Ct moyen (±ET) ^{&}		Ct moyen (±ET) ^{&}	ADN plasmidique (cp/μL)		ADN génomique *			2,41x10 ⁴	2,41x10 ³		Volume de mix réactionnel	20,5 μL	23,72 ± 0,19 ^a	28,21 ± 0,19 ^b	20,18 ± 0,16 ^{a b}	23 μL [#]	23,84 ± 0,12 ^a	27,77 ± 0,23 ^a	20,12 ± 0,09 ^a	25,5 μL	23,79 ± 0,13 ^a	27,58 ± 0,14 ^a	20,29 ± 0,15 ^b	Volume d'ADN template	1,8 μL	23,73 ± 0,25 ^a	27,75 ± 0,08 ^a	19,93 ± 0,08 ^a	2 μL [#]	23,84 ± 0,12 ^a	27,77 ± 0,23 ^a	20,12 ± 0,09 ^b	2,2 μL	24,12 ± 0,15 ^a	28,16 ± 0,18 ^b	19,93 ± 0,15 ^a
Paramètres	Variables testées	Ct moyen (±ET) ^{&}		Ct moyen (±ET) ^{&}																																								
		ADN plasmidique (cp/μL)			ADN génomique *																																							
		2,41x10 ⁴	2,41x10 ³																																									
Volume de mix réactionnel	20,5 μL	23,72 ± 0,19 ^a	28,21 ± 0,19 ^b	20,18 ± 0,16 ^{a b}																																								
	23 μL [#]	23,84 ± 0,12 ^a	27,77 ± 0,23 ^a	20,12 ± 0,09 ^a																																								
	25,5 μL	23,79 ± 0,13 ^a	27,58 ± 0,14 ^a	20,29 ± 0,15 ^b																																								
Volume d'ADN template	1,8 μL	23,73 ± 0,25 ^a	27,75 ± 0,08 ^a	19,93 ± 0,08 ^a																																								
	2 μL [#]	23,84 ± 0,12 ^a	27,77 ± 0,23 ^a	20,12 ± 0,09 ^b																																								
	2,2 μL	24,12 ± 0,15 ^a	28,16 ± 0,18 ^b	19,93 ± 0,15 ^a																																								



Température d'hybridation	56°C	25,24 ± 0,58 ^d	29,30 ± 0,64 ^d	21,01 ± 0,10 ^c
	58°C	24,10 ± 0,19 ^c	28,55 ± 0,22 ^c	20,10 ± 0,14 ^a
	60°C [#]	23,84 ± 0,12 ^{b,c}	27,77 ± 0,23 ^b	20,12 ± 0,09 ^a
	62°C	23,50 ± 0,18 ^a	27,23 ± 0,16 ^a	20,15 ± 0,09 ^a
	64°C	23,61 ± 0,11 ^{a,b}	27,32 ± 0,29 ^a	20,41 ± 0,38 ^b
<p>[#] valeurs des paramètres originaux</p> <p>* ADNg d'un échantillon de <i>Citrus</i> sp. naturellement contaminé</p> <p>& pour un paramètre donné, les valeurs des moyennes suivies de la même lettre pour le même échantillon, ne sont pas significativement différentes selon l'analyse de variance (test de Tukey/ logiciel 'R').</p> <p>• La robustesse de la spécificité a été démontrée dans les conditions diminuant la stringence de la réaction (diminution du volume réactionnel et de la température d'hybridation ou augmentation du volume d'ADN_template sur une solution concentrée d'ADNg de <i>P. lingam</i> et de <i>P. biglobosus</i> (espèces phylogénétiquement proches de <i>P. tracheiphilus</i>). Aucune réaction croisée avec ces organismes non-cibles n'a été observée.</p>				


Sensibilité relative	Ces critères n'ont pas été évalués de façon expérimentale par le laboratoire. Différentes méthodes - i) méthode par isolement du parasite à partir de rameaux infectés et identification morphologique des isolats obtenus, ii) méthode par détection moléculaire du parasite directement à partir de rameaux infectés, par PCR conventionnelle - ont été évaluées et parfois comparées dans la littérature scientifique. De plus, L'expérience du laboratoire, qui a mis en œuvre ces différentes techniques au cours du temps (notamment au cours de cette validation), permet de confirmer un niveau inférieur de sensibilité et/ou un manque de spécificité des méthodes citées ci-dessus.
Spécificité relative	
Exactitude relative	
Autres critères : Multiplexage	Le test en duplex donne des résultats conformes à ceux attendus. La méthode peut être utilisée en réaction duplex : détection cible + contrôle qualité ADN (<i>P. tracheiphilus</i> / 18S uni)
Autres critères : Durée d'analyse	Durée de l'analyse d'un échantillon utilisant la méthode : 1 journée
Autres critères : Contrôle de la qualité d'extraction d'ADN	Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test PCR 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 19,8 sur une série de 113 valeurs de Ct. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 31 échantillons (positifs) de rameaux de <i>Citrus</i> spp., avec le kit qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec) sur un appareil Rotorgene 6000 (Corbett Research).



Annexe 1 : symptômes de *P. tracheiphilus* sur *Citrus* sp.

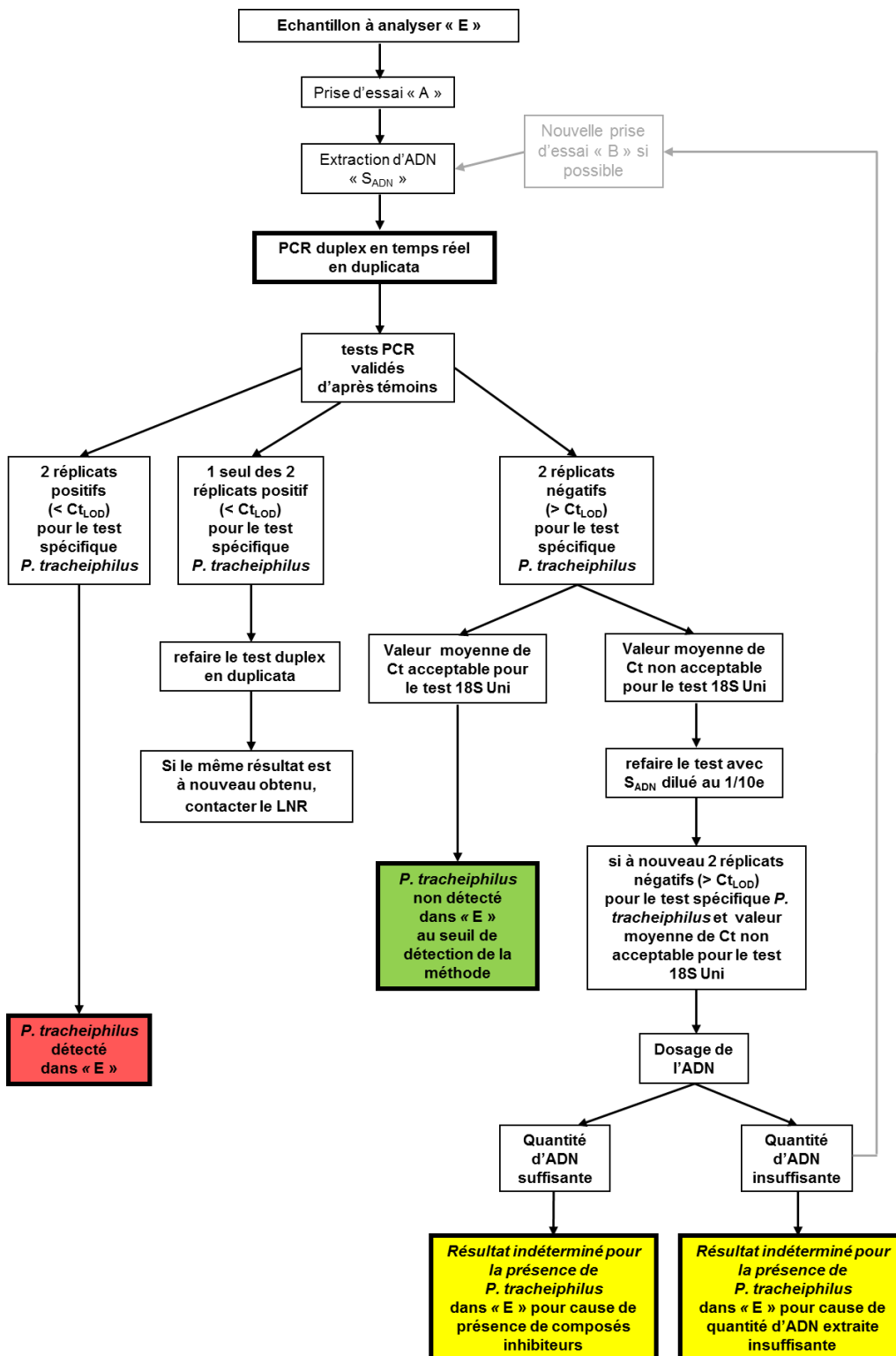
(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)



 Zones symptomatiques pour prélèvement de prises d'essai



Annexe 2 : schéma décisionnel





Bibliographie

Demontis M.A., Cacciola S.O., Orrù M., Balmas V., Chessa V., Maserti B.E., Mascia L., Raudino F., Magnano Di San Lio G., Migheli Q., 2008. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected *Citrus*. Eur J Plant Pathol 120, 339-351.

Ioos R, Fourrier C, Iancu G, Gordon TR, 2009. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. Phytopathology 99, 582-90.

Baker K.F., Davis L.H., Wilhem S., Snyder W.C., 1985. An aggressive vascular-inhabiting *Phoma* (*Phoma tracheiphila* f. sp. *chrysanthemi* nov. f. sp.) weakly pathogenic to chrysanthemum. Can. J. Bot. 63, 1730-1735.

Anonymous, 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. O.J.L 169, 10.7.2000, 1.