

## Méthode d'analyse en Santé des Végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA059- Version 1

Avril 2019

# Détection de *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et *Pseudocercospora angolensis* par PCR en temps réel quadruplex



(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons phytopathogènes sur toute matrice »



## 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*		Avril 2019	Version initiale

\*La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 25/01/2019 au 25/02/2019 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, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par l'unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en collaboration avec un chercheur de l'institut de recherche en phytopathologie du Caire (CRA). Ce projet visait à développer un test rapide pour la détection de trois agents phytopathogènes sur des fruits d'agrumes (*Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et *Pseudocercospora angolensis*) (Ahmed et al., 2018).

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



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>10</b>
5.1 Eau.....	10
5.2 Kits d'extraction d'ADN .....	10
5.3 Oligonucléotides .....	10
5.4 Kit d'amplification pour PCR en temps réel.....	11
5.5 Autres consommables à usage unique .....	11
5.6 Contrôles et témoins.....	11
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>13</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>14</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	14
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>15</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....	15
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total.....	15
8.3 Test de PCR en temps réel quadruplex .....	16
<b>9. Résultats</b> .....	<b>18</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	18
9.2 Calculs et expression des résultats .....	18
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe 1</b> .....	<b>22</b>
<b>Symptômes de <i>Elsinoë fawcettii</i></b> .....	<b>22</b>
<b>Symptômes de <i>Elsinoë australis</i></b> .....	<b>23</b>



<b>Symptômes de <i>Pseudocercospora angolensis</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>Annexe 2 : Tables décisionnelles .....</b>	<b>24</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>26</b>



## Introduction

*Elsinoë fawcettii* Bitancourt & Jenkins, 1936, *Elsinoë australis* Bitancourt & Jenkins, 1936, et *Pseudocercospora angolensis* (T. Carvalho & O. Mendes) Crous & U. Braun (Pretorius et al., 2003) sont des champignons phytopathogènes causant des maladies sur agrumes et pouvant occasionner des dégâts importants dans les régions où ils se sont établis. *E. fawcettii*, agent du « Citrus scab », *E. australis*, agent du « sweet orange scab » et *P. angolensis*, agent du « leaf and fruit spot » provoquent des lésions sur la peau des fruits (cf. Annexe 1) pouvant les rendre impropres à la commercialisation et entraîner d'importantes pertes économiques.

*Elsinoë fawcettii* et *E. australis* sont classés comme parasites de quarantaine par l'UE (Directive CE/2000/29-Annex IIAI) sous l'appellation « *Elsinoë* spp. ». *E. fawcettii* est présent dans de multiples régions agrumicoles à climat humide et affecte les fruits, les feuilles et les rameaux de nombreuses espèces de *Citrus* (Timmer et al., 1996). Contrairement à *E. fawcettii*, la présence d'*E. australis* est principalement restreinte à la partie méridionale de l'Amérique du Sud et cette espèce affecte les fruits mais pas les feuilles, de la plupart des cultivars d'oranges et de mandarines (Timmer et al., 1996). Ces deux espèces ne sont pas présentes dans l'Union Européenne.

*Pseudocercospora angolensis* est classé comme parasite de quarantaine par l'UE (Directive CE/2000/29-Annex IIAI) sous l'appellation « *Cercospora angolensis* ». Sa distribution est principalement localisée en Afrique subsaharienne et au Yemen. Bien que l'épidémiologie du parasite ne soit pas bien complètement connue, il semblerait que ses capacités d'infection soient favorisées par des températures chaudes et un taux d'humidité élevé. Le pathogène affecte les feuilles et les fruits d'espèces de *Citrus* et leurs hybrides. *Fortunella japonica* (Kumquat) est également décrit comme hôte tolérant à *P. angolensis*. En revanche, aucune information n'est actuellement disponible dans la littérature au sujet de la sensibilité des autres espèces de *Fortunella*, de *Poncirus* et leurs hybrides vis à vis de *P. angolensis* (EFSA, 2017). *P. angolensis* n'est pas présent dans l'Union Européenne.



## 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.**

### **Élimination 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 *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et *Pseudocercospora angolensis* dans des tissus végétaux. La présence de ces trois espèces est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sondes d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* et *Pseudocercospora angolensis* dans la limite du seuil de détection des techniques employées, sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de l'une ou de plusieurs de ces espèces ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

### Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode concerne les fruits de *Citrus* spp., *Fortunella* spp. et *Poncirus* spp. ainsi que leurs hybrides (cf. Directive UE 2000/29).

### Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur écorces de fruits présentant des symptômes.

### Grandeur de l'objet soumis à analyse :

Les échantillons soumis à l'analyse seront ainsi constitués d'un à plusieurs fruits présentant des lésions caractéristiques de *Elsinoë fawcettii*, *Elsinoë australis* ou de *Pseudocercospora angolensis* (cf. Annexe 1).

## 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...).

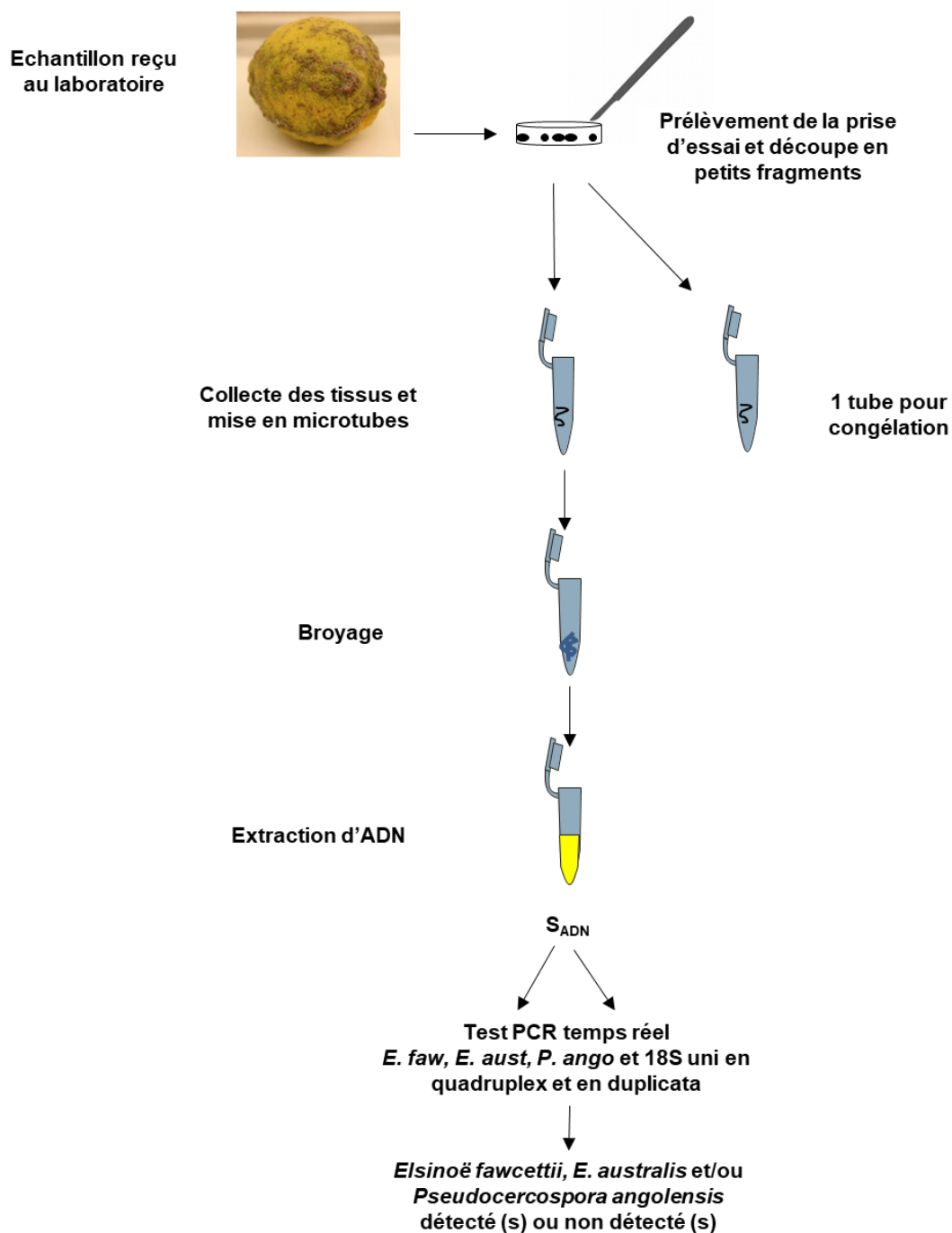
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.





## 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.

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 et ADN de microorganismes présent sur le prélèvement) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), en utilisant le tampon de lyse AP1 fourni par le fabricant (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011, Ahmed et al. (2018)).

### 5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>Elsinoë fawcettii</i>	E.faw-F <sup>a</sup>	AGA GCC GGA AAG GAG CAT G
	E.faw-R <sup>a</sup>	GAC TGC GTG GAA GGA AAA TTG C
	E.faw-P <sup>a</sup>	[FAM]-TGG GGC TGT CAT CCG TCA GT- [BHQ1]
<i>E. australis</i>	E.aust-F <sup>a</sup>	TCA GCC CAT GTC CGG TAT TG
	E.aust-R <sup>a</sup>	CGC ACT GAT TTA TCT ACC ATT GG
	E.aust-P <sup>a</sup>	[ROX]-CGC GCT CGA ACT GCA CAT GGT-[BHQ2]
<i>Pseudocercospora angolensis</i>	P.ango-F <sup>a</sup>	CCA CAC ATT CCT CTG CTC CT
	P.ango-R <sup>a</sup>	AGG CAT CGT ATC AGC AAG CT
	P.ango-P <sup>a</sup>	[Cy5]-TGA GCA TCG ACA ACA ACA CGC T-[BHQ2]
Plante/champignon	18S uni-F <sup>b</sup>	GCA AGG CTG AAA CTT AAA GGA A
	18S uni-R <sup>b</sup>	CCA CCA CCC ATA GAA TCA AGA
	18S uni-P <sup>b</sup>	[JOE]-ACG GAA GGG CAC CAG GAG T-[BHQ1]

<sup>a</sup> Ahmed et al (2018)

<sup>b</sup> loos et al. (2009)

Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté, et sous réserve de compatibilité avec l'appareil de PCR en temps réel employé.



## 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 011, Ahmed et al. (2018)).

## 5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Tubes de lysing matrix A de 2 mL (MP Biomedicals) (cf dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).

## 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 impose 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 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 au moins un des tests *E. fawcettii*, *E. australis* ou *P. angolensis* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection *E. fawcettii*, *E. australis* et *P. angolensis* (quadruplex). 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  $S_{ADN}$  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 le type de matrice testé (écorces de *Citrus* spp.) dans ses propres conditions. Dans les conditions de validation de ce test la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 15,84 (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).
- **Un témoin négatif d'extraction ( $T_{extr}$ )** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide", c'est-à-dire un microtube vide de lysing matrix A de 2 mL stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de



contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de T<sup>-extr</sup> doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.

- **Un témoin positif de test 18S uni (T<sub>+18S Citrus</sub>)** 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<sub>+18S Citrus</sub> est constitué d'une solution d'ADN génomique extraite d'écorces de *Citrus* spp. à une concentration finale d'environ 12 ng/μL.
- **Un témoin positif en limite pratique de détection (T<sub>+LOD</sub>)** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel. 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 *E. faecettii*, *E. australis* et *P. angolensis* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ces T<sub>+LOD</sub> sont chacun constitués d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR spécifique, E.faw-F/-R/-P, E.aust-F/-R/-P et P.ango-F/-R/-P. Ces T<sub>+LOD</sub> doivent être caractérisés par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T<sub>+LOD</sub> peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été déterminée à 242, 241 et 242 copies plasmidiques de cible par tube de PCR, respectivement pour *E. faecettii*, *E. australis* et *P. angolensis* (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).
- **Un témoin négatif d'amplification (T<sup>-</sup> ou NTC, no template control)** sera systématiquement introduit en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel. 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<sub>ADN</sub> dans les tubes individuels de PCR (2ème type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.



## 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.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022.

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	EMT définies par la MOA022 version en vigueur
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : $5^{\circ}\text{C}$ 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 fluorophores de type « FAM », « ROX », « Cy5 » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 011).
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).
- Broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente



## 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 d'au moins un fruit, présentant des symptômes (cf. 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 « quarantaine » doit figurer sur le colis.
- **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

En attendant l'analyse, l'échantillon devra être conservé à 5°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 15 jours.

### 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 fruits présentant des symptômes typiques d'une infection par *E. faecium*, *E. australis* ou *P. angolensis* ou éventuellement des symptômes douteux (cf. Annexe 1).

Les prélèvements sur écorces de fruits s'effectuent au niveau des lésions observées en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions les plus pertinentes et prélever autant de portions de lésions que nécessaire. (cf. Annexe 1).

Les portions de lésions sont ensuite découpées, à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée, en fragments de tissus les plus petits possible (environ 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 le ¼ du tube. À cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de fragments, 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 d'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.
2. **Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai**, centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon 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 au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN (fournie avec le kit d'extraction). Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.
4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur Fastprep et broyer environ 1 minute à 6,5 unités. Recommencer cette étape une deuxième fois.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube entre 15 et 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée 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. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'éluion. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel ( $S_{ADN}$ ).



### 8.3 Test de PCR en temps réel quadruplex

#### Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection (tests E.aust, E.faw, P.ango et 18S uni)

Le volume réactionnel est 20  $\mu\text{L}$  : 18  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel et 2  $\mu\text{L}$  de  $S_{\text{ADN}}$  à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 $\mu\text{L}$
qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec)*	1x
Amorce sens E.faw-F	0.3 $\mu\text{M}$
Amorce antisens E.faw-R	0.3 $\mu\text{M}$
Sonde E.faw-P	0.1 $\mu\text{M}$
Amorce sens E.aust-F	0.3 $\mu\text{M}$
Amorce antisens E.aust-R	0.3 $\mu\text{M}$
Sonde E.aust-P	0.1 $\mu\text{M}$
Amorce sens P.ango-F	0.3 $\mu\text{M}$
Amorce antisens P.ango-R	0.3 $\mu\text{M}$
Sonde P.ango-P	0.1 $\mu\text{M}$
Amorce sens 18S uni-F	0.3 $\mu\text{M}$
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 $\mu\text{M}$
Sonde 18S uni-P	0.1 $\mu\text{M}$

\* le pré-mix contient de l'Uracil-N-glycosylase (UNG pour prévenir les autocontaminations provenant des réactions d'amplification précédentes.

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 18  $\mu\text{L}$  par microtube.

#### Addition des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

L'addition des  $S_{\text{ADN}}$  à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de témoins s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

1. Les différentes solutions  $S_{\text{ADN}}$  correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2  $\mu\text{L}$  par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les  $S_{\text{ADN}}$  des différents contrôles sont ajoutées et testées en *duplicata* :  $T_{\text{-extr}}$ ,  $T_{\text{+LOD}}$ , etc. Pour le  $T_{\text{-}}$ , on substitue à la  $S_{\text{ADN}}$  2  $\mu\text{L}$  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

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *E. faecitii*, *E. australis* et *P. angolensis* sont les suivants (Ahmed *et al.*, 2018):

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Activation de l'UNG	50°C *	2 min *	1
2	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C *	10 min *	1
3	Dénaturation	95°C	15 sec	40
4	Hybridation - polymérisation	60°C	55 sec puis mesure des différentes fluorescences	

\* 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<sub>-extr</sub> n'a généré de fluorescence « FAM », « ROX », ou « Cy5 » 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<sub>ADN</sub>.
- Aucun des réplicats de T<sub>-</sub> (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM », « ROX », ou « Cy5 » 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<sub>ADN</sub>.
- Les réplicats de T<sub>+LOD</sub> ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM », « ROX », ou « Cy5 » 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 *E. fawcettii*, *E. australis* et *P. angolensis*.

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<sub>ADN</sub>, 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<sub>+LOD</sub> (=Ct<sub>LOD</sub>). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct<sub>LOD</sub> seront considérés comme positifs.

L'analyse des résultats pour une prise d'essai, ainsi que les règles de décision applicables sont présentées en annexe 2 (tables décisionnelles).



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MIAM 011.

Critère de performance	Résultats obtenus
<b>Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel</b>	<p>L'efficacité (E) de la réaction quadruplex sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE(1x), a été évaluée à :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. fawcettii</i> : 102% (R<sup>2</sup>=0,9999)</li> <li>- <i>E. australis</i> : 92,09% (R<sup>2</sup>=0,9985)</li> <li>- <i>P. angolensis</i> : 98,72% (R<sup>2</sup>=0,9997)</li> </ul> <p>Lorsque la gamme est préparée dans de l'ADN de <i>Citrus limon</i> à 1ng/μL, l'efficacité a été évaluée à :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. fawcettii</i> : 99,26% (R<sup>2</sup>=0,9997)</li> <li>- <i>E. australis</i> : 97,49% (R<sup>2</sup>=0,9998)</li> <li>- <i>P. angolensis</i> : 97,33% (R<sup>2</sup>=0,9993)</li> </ul> <p>Lorsque la gamme est préparée dans de l'ADN de <i>Citrus sinensis</i> à 1ng/μL, l'efficacité a été évaluée à :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>E. fawcettii</i> : 101,34% (R<sup>2</sup>=0,9996)</li> <li>- <i>E. australis</i> : 97,07% (R<sup>2</sup>=0,9999)</li> <li>- <i>P. angolensis</i> : 98,62% (R<sup>2</sup>=0,9998)</li> </ul> <p>Aucune différence significative d'efficacité ni de R<sup>2</sup> n'a été constatée lorsque les 3 cibles ont été testées diluées dans du TE (1x) ou dans de l'ADN de <i>Citrus</i>.</p>
<b>Sensibilité analytique</b>	<p>La sensibilité analytique a été estimée à 4,84.10<sup>3</sup>, 4,82.10<sup>3</sup> et 4,84.10<sup>3</sup> copies plasmidiques d'ADN cible (respectivement pour <i>E. fawcettii</i>, <i>E. australis</i> et <i>P. angolensis</i>) par tube de PCR (soit 242, 241 et 242 cp/μL) pour une réaction quadruplex avec dilution dans du TE (1x) en utilisant le qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec).</p>
<b>Spécificité analytique</b>	<p>La spécificité analytique a été évaluée in vitro sur 102 isolats de différentes espèces génétiquement proches de l'une ou l'autre des 3 cibles ou rencontrées couramment sur <i>Citrus</i>. Les tests ont été réalisés en utilisant le qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec).</p> <p>Le test est 100% spécifique.</p>
<b>Inclusivité</b>	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontré in vitro sur un panel représentatifs d'isolats de <i>E. fawcettii</i> (32 isolats), <i>E. australis</i> (6 isolats) et <i>P. angolensis</i> (6 isolats), en provenance de plusieurs continents et obtenus sur différentes espèces de <i>Citrus</i>.</p> <p>Toutes les souches de <i>E. fawcettii</i>, <i>E. australis</i> et <i>P. angolensis</i> testées sont détectées par leur test respectif, quelle que soit leur origine.</p>
<b>Répétabilité et reproductibilité</b>	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 3 concentrations proches de la LOD et sur 10 réplicats d'un extrait d'ADN génomique de l'espèce cible, préalablement normalisé à 1 ng/μL.</p>



Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

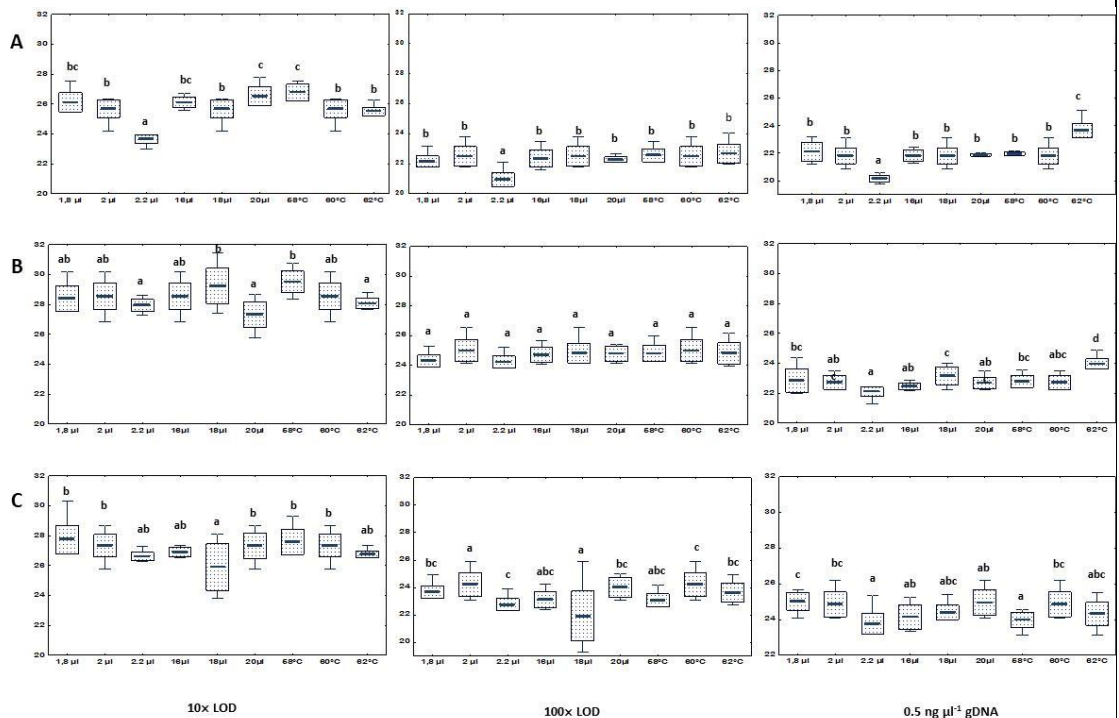
Target	Concentration	Intra-assay		Inter-assay	
		Mean Ct ± SD <sup>a</sup>	CV (%)	Mean Ct ± SD	CV (%)
<i>Elsinoë fawcettii</i>	1000× LOD <sup>b</sup>	18.79 ± 0.19	0.99	18.93 ± 0.21	1.11
	100× LOD	22.05 ± 0.11	0.49	22.24 ± 0.24	1.08
	10× LOD	25.38 ± 0.25	1.00	26.00 ± 0.14	0.55
	0.1 ng µL <sup>-1</sup> gDNA	21.42 ± 0.25	1.19	21.50 ± 0.34	1.60
<i>E. australis</i>	1000× LOD	19.58 ± 0.29	1.50	20.81 ± 0.54	2.60
	100× LOD	22.66 ± 0.22	0.96	24.53 ± 0.30	1.23
	10× LOD	25.60 ± 0.45	1.74	28.10 ± 0.77	2.76
	0.1 ng µL <sup>-1</sup> gDNA	20.94 ± 0.25	1.18	22.70 ± 0.90	3.96
<i>Pseudocercospora angolensis</i>	1000× LOD	19.23 ± 0.20	1.05	19.60 ± 0.25	1.26
	100× LOD	22.57 ± 0.11	0.49	23.20 ± 0.34	1.47
	10× LOD	26.00 ± 0.18	0.68	27.10 ± 0.67	2.47
	0.1 ng µL <sup>-1</sup> gDNA	23.38 ± 0.21	0.89	24.10 ± 0.37	1.55

La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10% pour les trois tests espèces-spécifiques.

Les trois tests espèces-spécifiques sont donc répétables et reproductibles., en format multiplex.

La robustesse a été évaluée d'une part en faisant varier le volume d'extrait d'ADN, le volume réactionnel de ± 10% et d'autre part en faisant varier la température d'hybridation/synthèse de ± 2°C, en testant 10 réplicats d'une solution plasmidique cible dosée à 2 concentrations proches de la LOD et 10 réplicats d'ADN extrait d'une culture fongique cible pour chacun des trois parasites. Les tableaux ci-dessous présentent les résultats de robustesse obtenus :

**Robustesse**





	<p>A : <i>Elsinoë fawcettii</i>  B : <i>Elsinoë australis</i>  C : <i>Pseudocercospora angolensis</i></p> <p><sup>a</sup> Les valeurs de Ct moyen avec la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey.</p> <p>Malgré des différences statistiques sur la valeur moyenne de Ct observées pour la variation du volume réactionnel, du volume d'extrait d'ADN et de la température d'hybridation, les résultats qualitatifs (détection des ADN cibles) restent inchangés pour chacun des trois tests espèces-spécifiques. Dans nos conditions, les trois tests espèces-spécifiques sont robustes, utilisés en multiplex.</p>
<p><b>Sensibilité relative</b></p> <p><b>Spécificité relative</b></p> <p><b>Exactitude relative</b></p>	<p>Ces critères ont été évalués de façon expérimentale par le laboratoire. La comparaison de cette méthode PCR en temps réel quadruplex avec la méthode par isolement mycologique a été effectuée avec un panel de 104 échantillons potentiellement naturellement contaminés par l'une ou l'autre des trois cibles. Les proportions de résultats positifs et négatifs obtenus par ces deux techniques ont été comparées par un test de Khi2.</p> <p>Au final, cette étude a démontré :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Une meilleure sensibilité relative de la méthode PCR en temps réel (Ahmed et al., 2018).</li> <li>- Une spécificité relative non significativement différente entre les deux techniques.</li> </ul>
<p><b>Autres critères</b> <i>Multiplexage</i></p>	<p>L'utilisation des tests dans un format quadruplex (3 cibles + contrôle d'extraction) a été comparée à leur utilisation respective en format cible monoplex. Les sensibilités analytiques des trois tests en quadruplex étaient non significativement différentes de celles obtenue lors d'une utilisation en monoplex.</p>
<p><b>Autres critères</b> <i>Durée d'analyse</i></p>	<p>Durée de la méthode PCR en temps réel quadruplex : environ une journée</p>
<p><b>Autres critères</b> <i>Contrôle de la qualité d'un extrait d'ADN</i></p>	<p>Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 15,84 sur une série de 90 valeurs de Ct. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 30 prélèvements sur différentes espèces de Citrus avec le kit PCR en temps réel qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec) sur un appareil Rotorgene 6500 (Corbett Research).</p>



## Annexe 1

### Symptômes de *Elsinoë fawcettii*





### Symptômes de *Elsinoë australis*



*Citrus reticulata* subsp. *Unshiu* (Argentine)

### Symptômes de *Pseudocercospora angolensis*



*Citrus sinensis* (Cameroun)



*Citrus paradisi* (Cameroun)

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)



## Annexe 2 : Tables décisionnelles

Type Résultat	Test E.faw	Test E.aust	Test P.ango	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	+/+	FIN	<i>E. fawcettii</i> détecté dans E <i>E. australis</i> détecté dans E <i>P. angolensis</i> détecté dans E
2	+/+	+/+	-/-	FIN	<i>E. fawcettii</i> détecté dans E <i>E. australis</i> détecté dans E
3	+/+	-/-	+/+	FIN	<i>E. fawcettii</i> détecté dans E <i>P. angolensis</i> détecté dans E
4	+/+	-/-	-/-	FIN	<i>E. fawcettii</i> détecté dans E
5	-/-	+/+	+/+	FIN	<i>E. australis</i> détecté dans E <i>P. angolensis</i> détecté dans E
6	-/-	+/+	-/-	FIN	<i>E. australis</i> détecté dans E
7	-/-	-/-	+/+	FIN	<i>P. angolensis</i> détecté dans E
8	-/-	-/-	-/-	Procéder à l'interprétation du test 18S uni	Cf table test 18S uni
9	+/-	Quel que soit le résultat	Quel que soit le résultat	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour E.faw : <i>E. fawcettii</i> détecté dans E. • Si résultat -/- obtenu pour E.faw et si aucune autre cible n'est détectée, procéder à l'interprétation du test 18S uni.
10	Quel que soit le résultat	+/-	Quel que soit le résultat	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour E.aust : <i>E. australis</i> détecté dans E. • Si résultat -/- obtenu pour E.aust et si aucune autre cible n'est détectée, procéder à l'interprétation du test 18S uni.
11	Quel que soit le résultat	Quel que soit le résultat	+/-	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour P.ango : <i>P. angolensis</i> détecté dans E. • Si résultat -/- obtenu pour P.ango, procéder à l'interprétation du test 18S uni si aucune autre cible n'est détectée.





Type Résultat	Test 18S uni	Action	Interprétation / démarche à suivre
A	+/+	FIN	<b><i>E. fawcettii</i> non détecté dans E</b> <b><i>E. australis</i> non détecté dans E</b> <b><i>P. angolensis</i> non détecté dans E</b>
B	+/-	Refaire test quadruplex sur S <sub>ADN</sub> diluée au 1/10e	Suite au nouveau test quadruplex, les résultats sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux obtenus sur les solutions pures. Si +/- ou -/- est obtenu à nouveau pour 18S uni, FIN : <b>Résultat indéterminé pour E</b> . Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)
C	-/-	Refaire test quadruplex sur S <sub>ADN</sub> diluée au 1/10e	Suite au nouveau test quadruplex, les résultats sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux obtenus sur les solutions pures. Si +/- ou -/- est obtenu à nouveau pour 18S uni, FIN : <b>Résultat indéterminé pour E</b> . Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)

\* Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai.



## Bibliographie

- Ahmed Y., Hubert J., Fourrier-Jeandel C., Dewdney M., Aguayo J., loos R, 2018. A Set of Conventional and Multiplex Real-Time PCR Assays for Direct Detection of *Elsinoë fawcettii*, *E. australis* and *Pseudocercospora angolensis* in Citrus Fruits. Plant Disease 10.1094/PDIS-05-18-0798-RE.
- Directive 2000/29/CE (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.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Gregoire, J. C., Anton, J., Miret, J., MacLeod, A., Navarro, M. N., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Urek, G., Bruggen, A. V., Werf, W. V. d., West, J., Winter, S., Gonzalez-Dominguez, E., Vicent, A., Vloutoglou, I., Bottex, B., and Rossi, V. 2017b. Pest categorisation of *Pseudocercospora angolensis*. EFSA Journal 15:4883.
- loos 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.
- Pretorius, M. C., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., and Braun, U. 2003. Phylogeny of some cercosporoid fungi from citrus. Sydowia 55:286-305.
- Timmer, L. W., Priest, M., Broadbent, P., and Tan, M. K. 1996. Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoe* causing scab diseases of citrus. Phytopathology 86:1032.