

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA065 - Version 01

Octobre 2020

Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur insectes vecteurs

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Mandat « bactéries sur autres 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*	Sans objet	Octobre 2020	Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 23/07/2020 au 23/09/2020 sur le site internet de l'agence.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité bactériologie, virologie et OGM

Laboratoire National de Référence : Mandat « bactéries sur autres matrices »

Adresse : 7 rue Jean Dixméras

49044 Angers Cedex 01

Contact : angers.lsv@anses.fr

Les travaux de développement, optimisation, évaluation et validation ont donné lieu à un rapport de caractérisation et de validation de la méthode en mars 2020.

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	6
Avertissements et précautions de sécurité	8
1. Objet et domaine d'application	9
2. Documents de référence	9
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode	10
5. Réactifs	11
5.1 Eau.....	11
5.2 Kit d'extraction d'ADN.....	11
5.3 Oligonucléotides	11
5.4 Kit de PCR en temps réel	12
5.5 Autres réactifs	12
5.6 Autres consommables à usage unique	12
5.7 Contrôles et témoins.....	13
6. Appareillage et matériels	14
7. Échantillons	15
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	15
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	16
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	16
8. Mode opératoire	17
8.1 Préparation des échantillons pour analyse (=prélèvement).....	17
8.2 Extraction de l'ADN total.....	18
Préparation des barrettes	19
Extraction et élution de l'ADN	20
Transfert final de l'ADN	20
8.3 Test de détection par PCR en temps réel	20
9. Résultats	23
9.1 Contrôle de la validité des résultats	23
9.2 Calculs et expression des résultats	23



10. Caractéristiques de performance.....	26
Annexe A : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile).....	29
Annexe B : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)	31
Bibliographie.....	33



Introduction

Xylella fastidiosa (Wells *et al.* 1987) est une bactérie phytopathogène réglementée dans l'Union Européenne. Elle est définie comme organisme de quarantaine prioritaire dans le règlement d'exécution (UE) 2019/2072 de la Commission du 28 novembre 2019 établissant des conditions uniformes pour la mise en œuvre du règlement (UE) 2016/2031 du parlement européen et du conseil du 26 octobre 2016. Il s'agit également d'un organisme de lutte obligatoire de façon permanente sur tout le territoire français, au sens de l'arrêté du 31 juillet 2000. L'arrêté du 22 mai 2015 relatif à la prévention de l'introduction du *X. fastidiosa* précise les conditions de lutte obligatoire, d'importation de végétaux spécifiés, de circulation de végétaux spécifiés dans l'Union Européenne et les obligations de déclaration en cas de présence ou de suspicion de *X. fastidiosa*.

X. fastidiosa est une bactérie du xylème présente sur le continent américain sur une large gamme d'hôtes. Il a été décrit à ce jour cinq sous-espèces de la bactérie, chacune plus ou moins inféodée à une gamme de plantes hôtes et/ou à une région géographique. Malgré un statut d'organisme réglementé de quarantaine pour l'Union Européenne et l'existence d'une réglementation à l'importation, *X. fastidiosa* est dorénavant un organisme émergent en Europe, avec la déclaration fin 2013 d'un foyer sur olivier en Italie (Loconsole *et al.*, 2014). En 2014, la bactérie a également été décrite en Iran sur vigne et amandier (Amanifar *et al.*, 2014). En France, la bactérie a été isolée en 2012 à partir de plants de caféiers (*Coffea arabica* et *C. canephora*) importés d'Amérique latine. En juillet 2015, la bactérie a été découverte sur le territoire corse, notamment sur polygale (*Polygala myrtifolia*), avant d'être détectée sur de nombreuses autres espèces végétales. En septembre 2015, des polygales étaient également détectés positifs à *X. fastidiosa* en région PACA. Depuis 2016, la bactérie est également présente en Allemagne (éradiquée), en Espagne et au Portugal depuis 2018.

Les principaux symptômes provoqués par *X. fastidiosa* sont des brûlures foliaires, suivi dans certains cas d'un dessèchement généralisé de la plante et de chloroses foliaires. Le site de l'OEPP, EPPO Global Database, propose une photothèque relative à la symptomatologie de *X. fastidiosa* (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>). Une fiche de reconnaissance des symptômes est disponible sur le site de l'Anses (<https://www.anses.fr/fr/system/files/VEG-Fi-XylellaFastidiosa.pdf>) et sur le site du ministère en charge de l'agriculture (<https://agriculture.gouv.fr/xylella-liens-utiles-et-documentation>). De nombreuses espèces végétales contaminées par la bactérie peuvent rester asymptomatiques et présenter de faibles à forts taux de contamination. Ainsi, l'importation de matériel végétal en provenance de zones contaminées par *X. fastidiosa* constitue une voie d'introduction pour les zones indemnes. A contrario, la symptomatologie n'étant pas caractéristique, des échantillons supposés symptomatiques peuvent présenter de faibles taux de contamination. La gamme d'hôtes de *X. fastidiosa* comprend plus de 595 espèces végétales appartenant à plus de 85 familles botaniques différentes (EFSA, 2020).

X. fastidiosa est transmise de plante à plante par des insectes piqueurs-suceurs se nourrissant de la sève brute (Hill *et al.*, 1997). 30 insectes vecteurs potentiels ont été répertoriés en France, dont 4 en Corse. A ce jour, 3 espèces ont été formellement identifiées en tant que vecteurs de *X. fastidiosa* en Europe (Italie), *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus campestris* et *Philaenus italosignus* (Cornara



et al., 2016) (Cavalieri *et al.*, 2019). Si cette dernière espèce est endémique de l'Italie, les 2 premières sont répandues en Europe où le cercope des prés (*P. spumarius*) y est très commun. Après acquisition de la bactérie, l'insecte adulte demeure définitivement porteur. *X. fastidiosa* est présente sous forme de biofilms dans la partie antérieure du système digestif de l'insecte (cibarium et précibarium) (OEPP, 2019).



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.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

La détention et/ou la manipulation de la bactérie *Xylella fastidiosa* est soumise à l'obtention d'un arrêté préfectoral d'agrément en accord avec le nouveau règlement de santé végétale 2016/2031. Il est nécessaire que les installations de laboratoire permettent le contrôle des déchets solides et liquides. Le laboratoire doit mettre en œuvre les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de cet organisme dans l'environnement. Cependant les insectes reçus au laboratoire pour analyse sont conditionnés en tubes dans de l'alcool, ce qui garantit l'absence de bactéries vivantes.



1. Objet et domaine d'application

La méthode caractérisée a pour objet la détection de la bactérie phytopathogène *X. fastidiosa* sur les insectes potentiellement vecteurs de celle-ci. Elle a été validée seulement sur *Philaenus spumarius* et s'applique sur tout autre insecte potentiellement vecteur de *X. fastidiosa* de taille similaire à *Philaenus spumarius* (par exemple *Neophilaenus campestris*), mais ne s'applique pas aux espèces de grande taille (par exemple *Cicada orni*). Elle s'applique sur tête d'insecte isolée du corps.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter la présence de *X. fastidiosa* dans la limite du seuil de détection de la technique employée, mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé, ni d'identifier la sous-espèce présente.

-Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme non porteurs de *X. fastidiosa* ou porteurs à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

-Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme porteurs de *X. fastidiosa*.

L'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *X. fastidiosa*, et ce quelle que soit la sous-espèce considérée, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de cette bactérie.

La méthode est basée sur une détection par PCR en temps réel en duplex (Harper *et al.*, 2010, erratum 2013 et contrôle interne loos *et al.*, 2009), précédée d'une extraction d'ADN reposant sur l'utilisation du kit commercial QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) et de l'automate d'extraction KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) ou équivalent en terme de performances attendues. Le kit d'extraction utilisé repose sur l'utilisation de microbilles magnétiques recouvertes de silice.

2. Documents de référence

MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification 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 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 des méthodes officielles.



4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans la figure 1 ci-dessous :

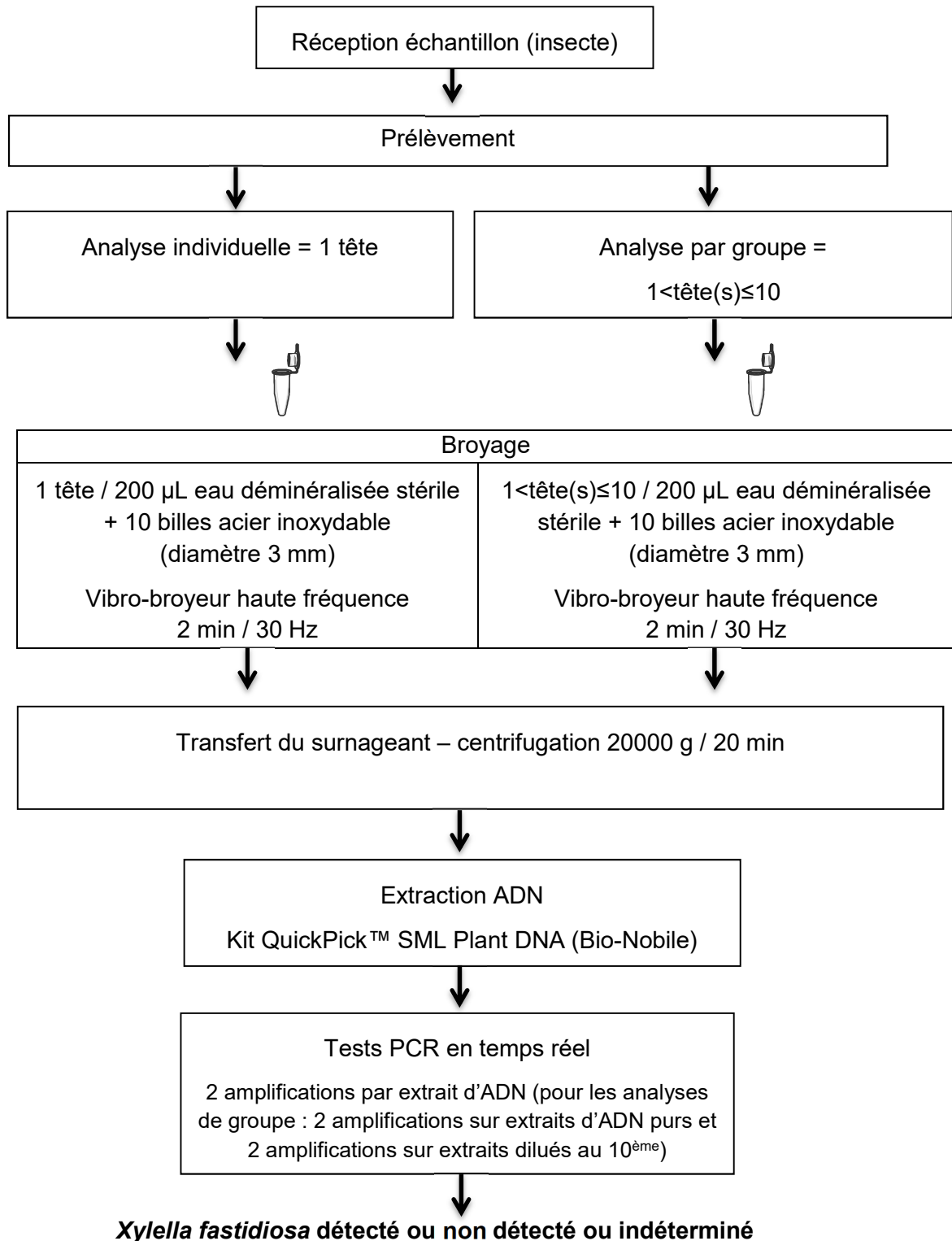


Figure 1 : Principe de la méthode



5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés 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, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ADN), 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 optimales.

5.1 Eau

Préparation d'échantillons

Les broyats doivent être réalisés avec de l'eau de qualité analytique stérile de type déminéralisée ou osmosée.

Analyse de PCR en temps réel

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

5.2 Kit d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce. Le kit d'extraction validé par le LNR pour cette méthode est le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile).

5.3 Oligonucléotides

Harper *et al.*, 2010 erratum 2013

Les séquences (5'- 3') des amorces et de la sonde sont les suivantes :

- XF-F* : CACGGCTGGTAACGGAAGA
- XF-R* : GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG
- XF-P* : [6-FAM]-TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC-[BHQ1]

* Cible des amorces XF-F et XF-R et de la sonde XF-P : 16S rRNA processing protein rimM (XF_0108) (Harper *et al.*, 2010, Erratum 2013)



Contrôle interne loos *et al.*, 2009

Les séquences (5' - 3') des amorces et de la sonde sont les suivantes :

- 18S uni-F* : GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
- 18S uni-R* : CCACCACCCATAGAATCAAGA
- 18S uni-P* : [Cy5]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ-2]

* Cible des amorces 18S uni F, 18S uni R et de la sonde 18S uni P : ADNr 18S (loos *et al.*, 2009)

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance.

Les fluorophores utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que pour chaque sonde le fluorophore extincteur soit adapté au rapporteur associé, que d'une sonde à l'autre les fluorophores rapporteurs soient différents et que l'appareil de PCR en temps réel employé soit compatible.

5.4 Kit de PCR en temps réel

Le kit validé par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour cette méthode est le TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG référence catalogue ThermoFisher scientific avril 2020 n°4352042.

5.5 Autres réactifs

- BSA (qualité biologie moléculaire - attention: ne pas utiliser de BSA acétylée)
- Produits courants de désinfection d'un laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire

5.6 Autres consommables à usage unique

- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés (plage 0,5 µL à 5 mL)
- Microtubes stériles 2 mL et 1,5 mL en fonction des étapes des protocoles
- Microtubes ou capillaires (qualité biologie moléculaire) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits
- Consommables spécifiques à l'utilisation des automates

Exemples de consommables spécifiques à l'utilisation des automates :

- Barrettes de tubes 5-Tube strip (1mL) et peignes 5-Rod Cover (Qiagen) pour le BioSprint 15
- Barrettes de tubes KingFisher™ mL tube strip 5 et peignes KingFisher™ mL Tip comb 5 (Thermo Fisher Scientific) pour le KingFisher™ mL
- Microplaques de 96 puits « KingFisher 96 plate », microplaque « KingFisher 96 Deepwell plate » et « tip comb » pour plaque 96 puits pour le KingFisher™ Flex



5.7 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert 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 à l'aide des 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),
- Il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles et témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- **Un contrôle négatif de processus** : il sera préparé pour chaque série d'extractions. 200 μ L d'eau de qualité analytique stérile subiront donc toutes les phases de l'analyse dès la mise en tube pour broyage, pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN. Il sera testé 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.
- **Un contrôle interne** de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur est réalisé pour chaque prise d'essai: il s'agit d'un contrôle interne universel eucaryote. La cible étant présente dans la matrice (insecte), il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel et permet également de mettre en évidence d'éventuelles inhibitions. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P (loos *et al.* 2009). Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN d'insecte est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant. Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test ciblant le 16S rRNA processing protein rimM (XF_0108) ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Une solution d'ADN sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) généré est \leq à 30.
- **Un contrôle positif de PCR** (ou témoin positif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon composée d'une solution d'acides nucléiques cibles (ex : lysat bactérien) subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la qualité de la manipulation et le bon fonctionnement du matériel.
- **Un contrôle négatif de PCR** (ou témoin négatif d'amplification) sera systématiquement introduit lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Une prise d'échantillon " eau ultra pure " 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.



Ces témoins sont ensuite traités à l'identique des autres échantillons. La duplication des extractions d'ADN et des dépôts d'ADN pour amplification n'est pas requise pour les contrôles.

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

En cas d'anomalies constatées sur un contrôle, les dispositions de la MOA022 doivent être respectées.

Dans le cas des analyses individuelles, où le contrôle interne donne un résultat négatif, le laboratoire doit réaliser une nouvelle amplification sur la solution d'ADN diluée au 10^{ème}.

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 version en vigueur. Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version 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 1 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
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 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

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

Thermocycleur : le constat de qualification (aptitude à l'usage attendu) se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique ou d'une vérification métrologique.

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

Préparation des échantillons



- Vibro-broyeur permettant d'atteindre une fréquence de 30 Hz (exemple : MM400 (Retsch))
- Portoir magnétique (par exemple : DynaMag™-2)
- Loupe binoculaire (grossissement env. X10) et système d'éclairage adapté
- Pipette automatique (plage de mesure de 1 à 5 mL) et/ou dispenseur
- Pinces pour l'entomologie (pinces de dissection)
- Scalpel

Extraction d'ADN selon le protocole QuickPick™

- Automate de type BioSprint 15 (Qiagen) ou KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) ou KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) compatible avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile).
- Agitateur de tubes de type Vortex
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 250 g à 20 000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse de paillasse type « microspin »
- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 5 mL)
- Thermobloc ou bain-à-sec avec agitation (température 65°C) (pour la lyse cellulaire) ou enceinte thermostatique (température 65°C) + système d'agitation

Equipement pour l'amplification

- Pipettes automatiques (plage de mesure de 0,5 µL à 1 mL)
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores employés (méthode validée avec l'appareil C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module BIORAD)

Stockage des échantillons et des ADN

- Congélateur (température ≤ -18°C)
- Réfrigérateur (température = 5°C)

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- Les échantillons reçus pour analyse doivent être stockés dans de l'éthanol 96% vol. Le transport peut être réalisé à température ambiante. Si les échantillons sont stockés avant d'être envoyés au laboratoire, ils doivent être conservés à une température ≤ à -18°C.



- 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.

Dans les cas contraires, le laboratoire informe le client dans les plus brefs délais en précisant les raisons du refus d'analyse.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à une température \leq à -18°C sans limitation de temps.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

L'analyse est destructive. Seul les extraits d'ADN sont donc conservés.

Cas d'un échantillon négatif : sauf mention contraire explicite les laboratoires doivent conserver les reliquats d'extraits d'ADN à une température \leq à -18°C au minimum jusqu'au quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif : Les reliquats d'extraits d'ADN doivent être conservés à une température \leq à -18°C pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les extraits éventuellement transmis à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.



8. Mode opératoire

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, ...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse (=prélèvement)

Un prélèvement est constitué :

- Pour une analyse individuelle : 1 tête
- Pour une analyse par groupe (1 tête < N ≤ 10 têtes) : N têtes



Figure 2 – Photo du matériel nécessaire à l'ablation de la tête d'insecte (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)



Figure 3 – Photo de *P. spumarius* observé à la loupe binoculaire (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)

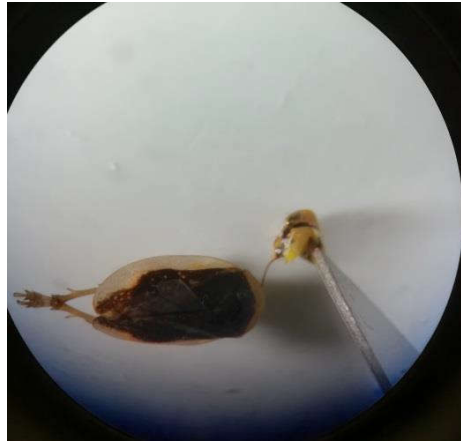


Figure 4 – Photo de *P. spumarius* observé à la loupe binoculaire après ablation de la tête (Source: A. Dintheer LSV Angers, 2018)

- L'insecte est déposé sur un papier absorbant pour éliminer l'éthanol.
- L'insecte est placé sur un autre papier absorbant dans un récipient type fond de boîte de Petri et placé sous une loupe binoculaire.
- Le corps de l'insecte est tenu avec des pinces, et le scalpel est inséré entre la tête et le thorax de l'insecte.
- La tête est séparée du thorax en appliquant une légère pression avec la pointe du scalpel.
- La tête ou le groupe de têtes est déposé dans **un microtube 2 mL (Ce prélèvement correspond à l'échantillon pour analyse.)**
- 200 µL d'eau déminéralisée stérile sont déposés dans le microtube 2 mL.
- 10 billes en acier inoxydable sont déposées dans le microtube 2 mL.
- Le tube est ensuite déposé dans le portoir du vibro-broyeur
- Le broyage est réalisé pendant 2 min à une fréquence d'agitation de 30 Hz.
- Le tube est ensuite centrifugé rapidement de manière à faire tomber les gouttes de broyat au fond du tube.
- La totalité du broyat est prélevée à la pipette et déposée dans **un microtube de 1,5 mL.**

Les billes d'acier peuvent être nettoyées en vue d'une utilisation ultérieure en les faisant tremper 2 min dans un bain d'hypochlorite de sodium (2,6% de chlore actif) et ensuite 1 min dans 2 bains d'eau déminéralisée successifs. Il est également possible de les exposer ensuite à un rayonnement ultra-violet après le bain.

8.2 Extraction de l'ADN total

Ce protocole nécessite l'appareil BioSprint15 (Qiagen), KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) ou KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) ainsi que les barrettes ou microplaques et capuchons plastiques décrits au point 5.6.

Ce protocole nécessite les composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) présentés dans le tableau 2 ci-après :



Reagent:	8 preps	24 preps	96 preps
Plant DNA Magnetic Particles ⁽¹⁾	40 µl	170 µl	540 µl
Plant DNA Proteinase K solution	40 µl	250 µl	700 µl
Plant DNA Lysis Buffer	600 µl	3.2 ml	8.5 ml
Plant DNA Binding Buffer ⁽²⁾	1 ml	4.25 ml	13.5 ml
Plant DNA Wash Buffer ⁽²⁾	6 ml 22 ml	2 x 40 ml	
Plant DNA Elution Buffer	1 ml	7 ml	22 ml

¹Reagents contain 0.02% NaN₃.

Tableau 2 : composants du kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

- Mettre en chauffe le thermobloc ou le bain-à-sec à 65°C.
- Centrifuger les tubes environ 20 minutes à environ 20 000 g à température ambiante.
- Jeter le surnageant.

Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade durant plusieurs jours en conservant les prélèvements au congélateur.

- Reprendre le culot avec 37,5 µL de tampon de lyse et 2,5 µL de protéinase K. Vortexer ou si nécessaire suspendre le culot avec une pipette par aspiration / refoulement (il est possible de reprendre le culot avec 40 µL d'une solution en mélange de tampon de lyse (37,5 µL) et de protéinase K (2,5 µL) préparée extemporanément).
- Incuber environ 20 minutes à 65°C avec agitation régulière (utilisation par exemple d'un thermobloc à agitation ou utilisation d'un agitateur de type Vortex toutes les 5 minutes environ).

Un contrôle négatif de processus est inséré dans chaque série lors de l'utilisation de l'automate.

Mode opératoire spécifique aux appareils BioSprint15 (Qiagen), KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific)

Préparation des barrettes

- Remettre les billes magnétiques en suspension par agitation manuelle et/ou pipetage (ne pas vortexer).
- Disposer les barrettes (1 mL) sur le plateau de l'automate.
- Disposer les peignes sur les aimants dans l'automate, en veillant au sens et à l'alignement.
- Déposer les solutions tampons dans les puits des barrettes, selon le tableau 3 suivant :



Etape	Binding		Wash 1	Wash 2	Wash 3	Elution
Côté gauche = languette	A		B	C	D	E
Tampon	Binding buffer	Magnetic particles	Wash buffer	Wash buffer	Wash buffer	Elution buffer
Volume (µL)	62,5	2,5	125	125	125	50

Tableau 3 : plan de dépôt des solutions tampons

Extraction et élution de l'ADN

- Centrifuger les lysats environ 5 min à environ 18 000 g à température ambiante.
- Reprendre la totalité du surnageant (env. 40 µL) et le déposer dans le puits A de la barrette, mettre le plateau dans l'appareil.
- Allumer l'automate et démarrer le programme spécifique (durée environ 31 minutes). Le programme est décrit en annexe A.

Transfert final de l'ADN

- Sortir le plateau et transférer si besoin l'ADN dans un nouveau tube. La solution d'ADN est alors prête à l'emploi. Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur avant analyse, ou au congélateur pour une conservation sur plusieurs semaines ou plusieurs mois.

Mode opératoire spécifique à l'appareil KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific)

Dans ce cas il n'est pas utilisé de barrettes, mais des plaques 96 puits. Les volumes déposés sont identiques. A chacune des différentes étapes : binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3 / élution, correspond une plaque. L'ensemble des puits utilisés d'une plaque 96 est donc rempli avec le tampon ou mélange correspondant à l'étape. Pour les étapes binding / lavage 1 / lavage 2 / lavage 3, les plaques utilisées sont les « KingFisher 96 Deepwell plates ». Pour l'étape d'élution, utiliser les « KingFisher 96 plates ». Avec cet automate, le transfert des éluats est réalisé automatiquement.

Le programme spécifique (durée environ 31 minutes) est décrit en annexe B.

Il est possible de stocker la solution d'ADN plusieurs jours au réfrigérateur avant analyse, puis au congélateur pendant plusieurs mois.

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Pour chaque série d'amplification, réaliser un témoin négatif d'amplification et un témoin positif d'amplification tel que décrit au point 5.7.

Pour les analyses individuelles, l'amplification est réalisée sur extraits d'ADN purs à raison de 2 amplifications par extrait.



Pour les analyses de groupes, l'amplification est obligatoirement réalisée sur extraits d'ADN purs et dilués au 10^{ème}, à raison de 2 amplification pour l'extrait pur et de 2 amplifications pour l'extrait dilué.

La composition du mélange réactionnel pour une réaction est présentée dans le tableau 4 ci-après :

Réactifs	Concentration finale ou volume final
Eau ultra pure	qsp 18 µL
TaqMan™ Fast Universal Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	1 X
Amorce sens XF-F	0,3 µM
Amorce antisens XF-R	0,3 µM
Sonde XF-P	0,10 µM
Amorce sens 18S uni-F	0,15 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0,15 µM
Sonde 18S uni-P	0,05 µM
BSA	0,3 µg/µL
Mélange réactionnel	18 µL
Extrait d'ADN	2 µL
Volume final	20 µL

Tableau 4 : composition du mélange réactionnel

Les différents paramètres de l'amplification par PCR en temps réel pour la détection de *X. fastidiosa* sont présentés dans le tableau 5 ci-après:



Etape	Température	Durée programmée	Nombre de cycle
Activation de l'ADN polymérase	50°C	2 min	1
	95°C	10 min	
Dénaturation	94°C	10 s	40
Hybridation / Elongation (mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle)	62°C	40 s	

Tableau 5 : paramètres d'amplification



9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel en échelle linéaire et logarithmique pour être prise en compte.

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur.

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 contrôles.

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

- Le contrôle négatif de processus et le témoin négatif d'amplification n'ont pas généré de courbe de fluorescence caractéristique, ni de valeur de Ct, ou bien une valeur de Ct > à 38. Ils permettent de vérifier l'absence de contamination croisée accidentelle.
- Le témoin positif d'amplification a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct ≤ à 38.
- Le contrôle interne a généré une courbe de fluorescence de type exponentielle et une valeur de Ct ≤ à 30 (condition obligatoire uniquement pour les échantillons négatifs pour la cible *Xylella fastidiosa*).

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée.

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables.

La publication Harper *et al.* 2010, Erratum 2013 précise que le cut-off de la méthode est 38. Selon Cuntly *et al.*, (2020), une valeur de Ct de 38 correspond à une charge bactérienne de 29 cellules de *X. fastidiosa* par tête de *P. spumarius*, dans nos conditions.

Les règles d'interprétation des résultats de chaque réplicat sont présentées dans le tableau 6 ci-après :

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct ≤ 38	Positif
Ct > 38	Négatif

Tableau 6 : règle de cut-off applicable pour la cible *X. fastidiosa*

Valeur de Ct obtenue pour le réplicat	Statut du réplicat
Ct ≤ 30	Positif
Ct > 30	Négatif

Tableau 6 bis : règle de cut-off applicable pour la cible 18S (contrôle interne)



L'interprétation en fonction des résultats des réplicats est présentée dans le tableau 7 ci-après :

Résultat final Cible <i>X. fastidiosa</i>	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
+/+	Fin	<i>X. fastidiosa</i> détecté
+/-	Refaire le test duplex	Suite au nouveau test duplex, si résultat +/+ ou +/-, : <i>X. fastidiosa</i> détecté Si résultat -/-, interpréter le test 18S uni
-/-	Interpréter le test 18S uni	Cf. tableau 8 test 18S uni

Tableau 7 : interprétation des résultats test *X. fastidiosa*

Résultat final Cible 18S uni	Action	Interprétation / marche à suivre / Expression des résultats
+/+	Fin	<i>X. fastidiosa</i> non détecté
+/-	Refaire test duplex sur ADN dilué au 10ème	Suite au nouveau test duplex, les résultats sur les ADN dilués sont interprétés comme ceux obtenus sur les ADN non dilués Si +/- ou -/- à nouveau obtenu pour 18S uni, Fin : Résultat indéterminé (préciser la cause sur le dossier analytique et sur le rapport : présence d'effet inhibiteur)
-/-	Refaire test duplex sur ADN dilué au 10ème	Suite au nouveau test duplex, les résultats sur les ADN dilués sont interprétés comme ceux obtenus sur les ADN non dilués Si +/- ou -/- à nouveau obtenu pour 18S uni, Fin : Résultat indéterminé (préciser la cause sur le dossier analytique et sur le rapport : présence d'effet inhibiteur)

Tableau 8 : interprétation des résultats du test 18S uni



Ces tableaux décisionnels sont également valables en cas d'introduction de dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN. Ainsi, en présence d'inhibiteurs mise en évidence par l'absence d'amplification avec le contrôle interne (renouvellement de l'amplification), l'interprétation est réalisée soit sur la série des extraits dilués soit sur la série des extraits non dilués. La série choisie est celle amenant au nombre maximum de positif(s).

Remarque 1 : l'extraction d'ADN pourra également être renouvelée sur décision du laboratoire.

Remarque 2 : dans le cas où le résultat pour un échantillon est interprétable uniquement après dilution au 1/10^{ème} de l'extrait d'ADN, il n'est pas nécessaire de le préciser sur le rapport d'analyses.

Expression des résultats sur le rapport d'analyse

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative : « négatif / positif / indéterminé », « détecté / non détecté / indéterminé » ou mention équivalente.

La référence de la méthode d'analyse utilisée sera mentionnée, par exemple: « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur insectes vecteurs - méthode MA065 ».



10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode est extraite de la version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA065 version 1 « Détection de *Xylella fastidiosa* par PCR en temps réel sur l'insecte vecteur *Philaenus spumarius* » établi par le LNR en mars 2020.

Résultats sur souches pures

Le tableau 9 ci-après présente les résultats d'inclusivité et d'exclusivité :

Caractéristique	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	100%	<u>15 souches cibles :</u> <ul style="list-style-type: none">- 3 <i>X.f.</i> subsp. <i>fastidiosa</i>- 3 <i>X.f.</i> subsp. <i>pauca</i>- 2 <i>X.f.</i> subsp. <i>sandyi</i>- 6 <i>X.f.</i> subsp. <i>multiplex</i>- 1 <i>X.f.</i> subsp. <i>morus</i>
Exclusivité	100%	<u>40 souches non cibles :</u> <ul style="list-style-type: none">- 1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>- 1 <i>Clavibacter insidiosus</i>- 1 <i>Erwinia amylovora</i>- 1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>- 1 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>- 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>- 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>- 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>- 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>- 1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>- 1 <i>Pseudomonas viridiflava</i>- 1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>- 1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>- 1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolia</i>- 1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>viticola</i>- 1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>- 1 <i>Xanthomonas fragariae</i>- 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>- 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>hederae</i>- 1 <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>



		<ul style="list-style-type: none"> - 1 <i>Xanthomonas translucens</i> pv.<i>graminis</i> - 1 <i>Xylophilus ampelinus</i> - 1 Phytoplasme Bois noir - 1 Phytoplasme flavescence dorée - 5 bactéries saprophytes isolées de <i>Lavandula</i> sp. - 5 bactéries saprophytes isolées de <i>Rosmarinus officinalis</i> - 6 bactéries saprophytes isolées de <i>Westringia fruticosa</i> <p>Concentration des suspension bactérienne $\approx 10^7$ bact./mL</p>
--	--	--

Tableau 9 : Valeurs des critères de performance sur souches pures

Résultats sur broyats de tête(s) d'insecte(s) (*Philaenus spumarius*) artificiellement contaminés

La méthode a été évaluée sur des échantillons constitués d'une tête de *P. spumarius* (analyse individuelle) ou 10 têtes (analyse par groupe) broyées dans de l'eau déminéralisée stérile, artificiellement contaminées par des gammes décimales de suspensions bactériennes lysées et calibrées (souche *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* LNPV 24.34 (CFBP 7970)). Les concentrations finales ont été de 1.10^2 à 1.10^5 cellules./tête d'insecte selon les modalités d'essais. La contamination des broyats a été réalisée avant l'étape de lyse.

Afin de déterminer la concentration des suspensions bactériennes, celles-ci ont été, préalablement à la lyse, dénombrées systématiquement soit par microscopie selon la technique de l'immunofluorescence avec utilisation d'un antisérum spécifique, soit par PCR digitale.

Pour la méthode d'analyse individu par individu, trois extractions ont été réalisées pour chaque concentration bactérienne et 3 amplifications ont été réalisées par extraction. Les essais ont été réitérés sur 3 jours différents.

Pour la méthode sur groupe de 10 individus, trois extractions ont été réalisées pour chaque concentration bactérienne et 3 amplifications ont été réalisées par extraction. Les essais ont été réitérés sur 2 jours différents. Pour les matrices non dopées, une extraction et trois amplifications ont été réalisées. Les essais n'ont pas été réitérés sur 3 jours, faute de spécimens de *P. spumarius*.

La caractérisation de la méthode a été réalisée sur un seul appareil (C1000 Touch thermal cycler / Bloc CFX96 Real optics module, BIORAD).



Les valeurs des caractéristiques de performance sont présentées dans le tableau ci-après.

Caractéristique de performance	Matrice	Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation
Inclusivité	Souches pures	100%
Exclusivité	Souches pures	100%
Seuil de détection (au taux de détection de 100%)*	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	1.10 ³ cellules./tête
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	1 insecte contaminé à 1.10 ³ cellules./tête parmi 9 insectes sains
Sélectivité au-dessus du seuil de détection	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	100%
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	100%
Spécificité	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	100%
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	100%
Exactitude	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	100%
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	100%
Répétabilité	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	100%
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	100%
Reproductibilité	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse individuelle	100%
	<i>P. spumarius</i> (tête) : analyse groupe de 10 individus	100%

Tableau 10 : Valeurs des caractéristiques de performance



Annexe A : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

Reagent info

A (Binding)			
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Sample	40	-	Reagent
Beads	3	-	Reagent
Binding buffer	63	-	Reagent
B (Wash 1)			
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
C (Wash 2)			
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
D (Wash 3)			
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent
E (Elution)			
Name	Well volume [μl]	Total reagent volume [μl]	Type
Elution buffer	50	-	Reagent



Steps data








 Tip1	Tip comb
 Binding	96 DW (A) - Binding
Beginning of step	Precollect No
	Release beads Yes
Mixing / pause:	Mixing time, speed 00:10:00, Medium
	Pause for manual handling No
End of step	Postmix No
	Collect count 5
	Collect time [s] 10
 Wash 1	96 DW (B) - Wash 1
Beginning of step	Precollect No
	Release time, speed 00:00:10, Medium
Mixing / pause:	Mixing time, speed 00:00:20, Medium
	Pause for manual handling No
End of step	Postmix No
	Collect count 5
	Collect time [s] 10
 Wash 2	96 DW (C) - Wash 2
Beginning of step	Precollect No
	Release time, speed 00:00:10, Medium
Mixing / pause:	Mixing time, speed 00:00:20, Medium
	Pause for manual handling No
End of step	Postmix No
	Collect count 5
	Collect time [s] 10
 Wash 3	96 DW (D) - Wash 3
Beginning of step	Precollect No
	Release time, speed 00:00:10, Medium
Mixing / pause:	Mixing time, speed 00:00:20, Medium
	Pause for manual handling No
End of step	Postmix No
	Collect count 5
	Collect time [s] 10
 Elution	96 DW (E) - Elution
Beginning of step	Precollect No
	Release time, speed 00:00:10, Medium
Mixing / pause:	Mixing time, speed 00:10:00, Slow
	Pause for manual handling No
End of step	Postmix No
	Collect count 5
	Collect time [s] 10
 Leave	96 DW (D) - Wash 3
	Release time, speed 00:00:05, Fast

Tableau 11: Programme de l'automate d'extraction KingFisher™ mL (Thermo Fisher Scientific) avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA

Nota bene : si nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR. Ne pas utiliser de version du logiciel BindIt antérieure à la version 3.2.



Annexe B : Programme d'extraction pour l'automate KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors (Thermo Fisher Scientific) automate pour le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile)

Reagent info

Tip Comb		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
-	-	-	-

Elution		96 standard plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Elution buffer	50	-	Reagent

Binding		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Lysat	40	-	Reagent
magnetic particles	3	-	Reagent
binding buffer	63	-	Reagent

Wash1		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash buffer	125	-	Reagent

Wash 2		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash Buffer	125	-	Reagent

Wash 3		96 DW plate	
Name	Well volume [µl]	Total reagent volume [µl]	Type
Wash Buffer	125	-	Reagent



Steps data









	Tip1	96 DW tip comb	
	Pick-Up	Tip Comb	
	Binding	Binding	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release beads	Yes
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:10:00, Medium
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
	Wash1	Wash1	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
	Wash2	Wash 2	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
	Wash3	Wash 3	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:00:20, Medium
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
	Elution	Elution	
	Beginning of step	Precollect	No
		Release time, speed	00:00:10, Medium
	Mixing / heating:	Mixing time, speed	00:10:00, Slow
		Heating during mixing	No
	End of step	Postmix	No
		Collect count	5
		Collect time [s]	10
	Leave	Wash 3	

Tableau 12: Programme de l'automate d'extraction KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific) avec le kit QuickPick™ SML Plant DNA

Nota bene : si nécessaire, le script informatique du programme est disponible auprès du LNR. Ne pas utiliser de version du logiciel BindIt antérieure à la version 3.2.



Bibliographie

Amanifar N., Taghavi M., Izadpanah K., Babaei G., Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran, *Phytopathologia Mediterranea* (2014), 53, 2, 318–327.

Cavaliere V., Altamura G., Fumarola G., di Carolo M., Saponari M., Cornara D., Bosco D. and Dongiovanni C., Transmission of *Xylella fastidiosa* Subspecies *Pauca* Sequence Type 53 by Different Insect Species (2019), *Insects*, 10, 324.

Cornara Daniele, Sicard Anne, Zeilinger AR, Porcelli Francesco, Purcell AH and Almeida RPP. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevine by the meadow spittlebug (2016), *Phytopathology*, Vol 106, No 11, 1285-1290.

Cunty A., Legendre B., De Jerphanion P., Juteau V., Forveille A., Germain J.F., Ramel J.M., Reynaud P., Olivier V., Poliakoff F., (2020), *Xylella fastidiosa* subspecies and sequences types detected in *Philaenus spumarius* and in infected plants in France share the same locations, *Plant Pathology*, 00 : 1-14. <https://doi.org/10.1111/ppa.13248>

Dintheer A., Amélioration de la méthode de détection de *Xylella fastidiosa* sur insectes vecteurs (2018), Anses LSV, Licence professionnelle Gestion de la santé des plantes 2017/2018, Université d'Angers.

EFSA, Update of the *Xylella* spp. host plant database, Systematic literature search up to 30 June 2019, SCIENTIFIC REPORT, EFSA Journal 2020;18(4):6114. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6114

European Plant Protection Organization, EPPO Standards PM 7 – Diagnostics PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2019) 49 (2), 175–227.

Harper S.J., Ward L.I. and Clover G.R.G.. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications (2010, erratum 2013) *Phytopathology*, 12, 1282-1288.

Ioos R., Fourrier C., Iancu G., and Gordon T. R., 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 (2009), *Phytopathology*, 99, 582-590

Loconsole G., Potere O., Boscia D., Altamura G., Djelouah K., Elbeaino T., Frasher D., Lorusso D., Palmisano F., Pollastro P., Silletti M.R., Trisciuzzi N., Valentini F., Savino V. and Saponari M., Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods (2014), *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 7-14.

Hill B. L. and Purcell A. H., Populations of *Xylella fastidiosa* in Plants Required for Transmission by an Efficient Vector (1997), *Phytopathology*, Vol. 87, No. 12, 1197-1201.

Wells J.M., Raju B.C., Hung H-Y., Weisburg W.G., Mandelco-Paul L., Brenner D.J., *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. (1987), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 136-143