

Méthode d'analyse en en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA067- Version 01

Juillet 2022

Identification spécifique de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par PCR temps réel sur un ensemble de kystes

Laboratoire de la santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Autres nématodes sur toutes matrices »

Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
01*	/	/	Version initiale

* La version 01 a fait l'objet d'une consultation du 07 avril 2022 au 06 juin 2022 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été optimisée et validée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Nématologie

Laboratoire National de Référence : Autres nématodes sur toutes matrices

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte

BP 35327

35653 LE RHEU Cedex

France

Contact : rennes.lsv@anses.fr

La présente méthode est basée sur l'outil de PCR temps réel décrit dans Gamel *et al.* 2017 qui a été développé par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en partenariat avec l'UMR IGEPP de l'INRAE du Rheu.

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

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	8
5.1 Eau.....	9
5.2 Kit d'extraction d'ADN.....	9
5.3 Oligonucléotides	9
5.4 Pré-mix commercial	9
5.5 Contrôles	10
5.6 Consommables divers	10
6. Appareillage et matériels	10
7. Échantillons	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	11
8. Mode opératoire	12
8.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	12
8.2 Extraction des acides nucléiques.....	12
8.3 Amplification génomique par PCR en temps réel.....	13
9 Résultats	14
9.1 Contrôle de la validité des résultats	14
9.2 Calculs et expression des résultats.....	14
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Bibliographie	18

Introduction

Les nématodes à kystes du genre *Globodera* sont des parasites obligatoires présentant une grande spécificité d'hôte. La plupart des espèces sont inféodées aux Solanacées, alors que d'autres se développent sur Astéracées et Rosacées.

Originaires des Andes, les espèces *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* ont été introduites en Europe au cours du XIXe siècle. La pomme de terre est la principale plante hôte de ces nématodes, mais on recense également la tomate et l'aubergine. Ces nématodes peuvent provoquer d'importantes diminutions de rendement ainsi que des pertes d'ordre qualitatif en cas de fortes attaques. Dans ce cas, les symptômes de « piqûres » visibles sur tubercules peuvent rendre la production non commercialisable.

Sa forme de conservation, le kyste, lui permet de survivre pendant plusieurs années, même en l'absence de plante hôte. C'est également cette forme enkystée qui peut être disséminée sur de longues distances par transport passif, via notamment du matériel végétal ou du sol contaminé.

Étant donné les dégâts occasionnés par ces nématodes, ils sont réglementés en Union Européenne et par une majorité de pays dans le monde (EPPO 2017).

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.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode décrit les modalités d'identification des nématodes à kystes de la pomme de terre, *Globodera pallida* et *rostochiensis*, dans un ensemble de kystes. Elle repose sur une identification des deux espèces en réalisant une extraction d'ADN globale sur des kystes de type *Globodera* puis une analyse utilisant la technique de PCR en temps réel.

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 et identification des organismes phytopathogènes.
- [2] MOA GLO 001 : glossaire général et technique en vigueur au LNPV.
- [3] Rapport de caractérisation et de validation de mars 2022 de la méthode d'identification spécifique de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par PCR temps réel sur individus isolés et dans un ensemble de kystes.

3. Termes, sigles et définitions

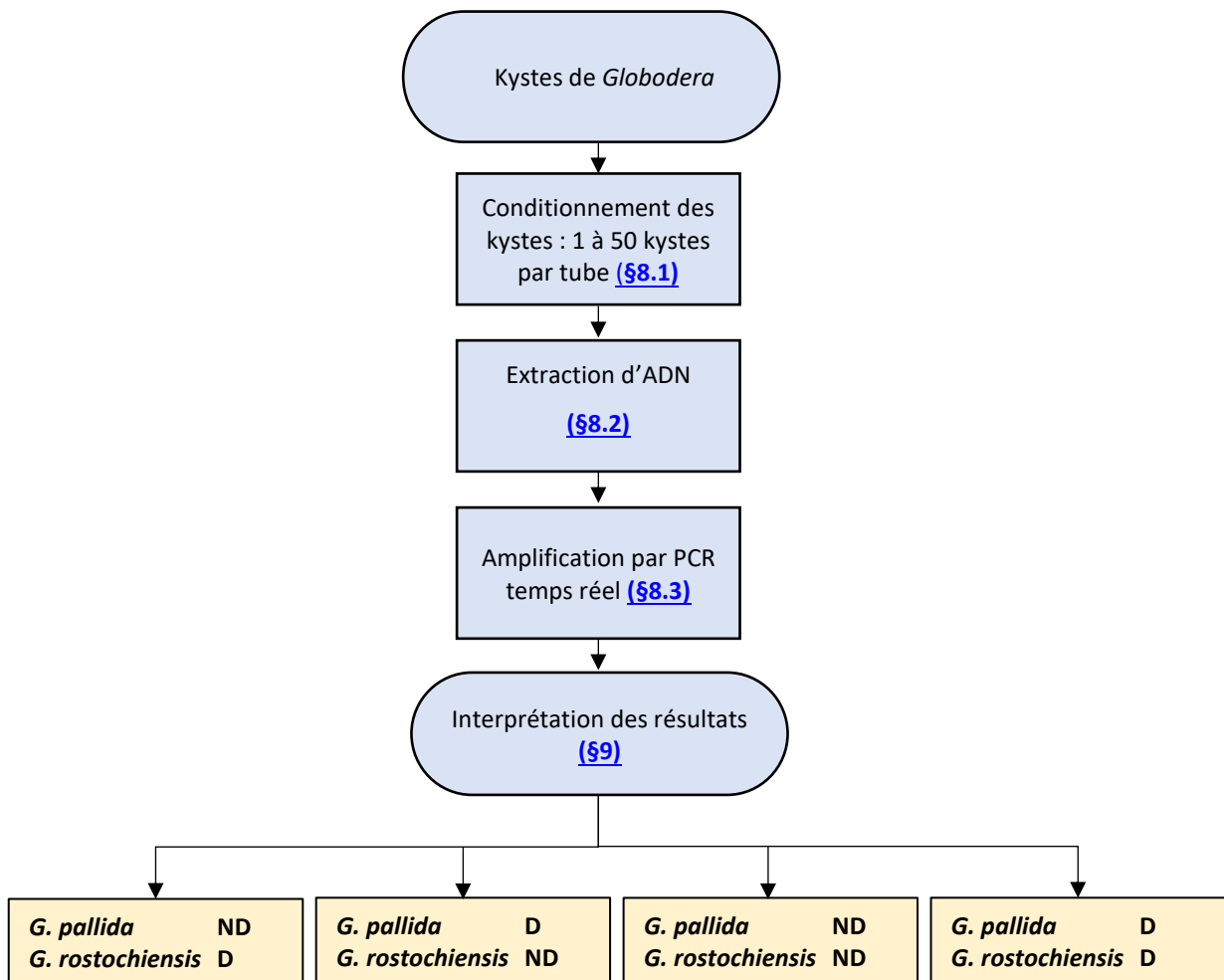
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire MOA 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.

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.

4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est représenté dans le schéma ci-dessous :



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.

5.1 Eau

Eau du robinet

Eau ultra pure de qualité biologie moléculaire

5.2 Kit d'extraction d'ADN

L'ADN des échantillons (groupe de kystes) est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce : kit QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®). Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN préconisé (cf. §10 – seuil de détection).

5.3 Oligonucléotides

Les séquences des amorces et sondes sont les suivantes :

Cible	Amorces et sondes	Séquences 5'→3'
<i>G. rostochiensis</i>	μsatGr-F	TGACGAGGAACAGTACAAAG
	μsatGr-R	GTGTCTCTAATTTGCCATT
	μsatGr-S	FAM-AGGCATTGCTTGAGCGAACGGA-BHQ1
<i>G. pallida</i>	μsatGp-F	AAGGAGTTGTGGTCCAGACG
	μsatGp-R	GAAGGCAATCTGTGTTCCGGG
	μsatGp-S	JOE-CGCTCGTCGGCCTCCTCCTC-BHQ1

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 Pré-mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant les réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl₂, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode. Le protocole a été évalué en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics.

5.5 Contrôles

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- un témoin positif de processus (E+) : 1 kyste (soit *Globodera pallida*, soit *Globodera rostochiensis*) traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

- un témoin négatif de processus (E-) : de l'eau identique à celle utilisé pour les échantillons et dans un volume identique, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

- deux témoins positifs de PCR (A+) : un pour chaque cible: il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *Globodera pallida* et un autre de *Globodera rostochiensis* ; ces témoins permettent de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.

- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

- un témoin d'inhibition (TI) : pour les échantillons qui ne montrent aucune amplification, une nouvelle réaction PCR doit être réalisée sur ces échantillons en ajoutant un ADN cible dans le mélange réactionnel afin de vérifier l'absence d'effet inhibiteur dans la solution d'ADN des échantillons.

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de *Globodera pallida* et/ou *rostochiensis* pour les contrôles positifs, l'absence de contamination pour les contrôles négatifs et l'absence d'effet inhibiteur).

5.6 Consommables divers

- Microtube 1,5 mL
- Piston Pellet pour tube 1,5 mL
- Billes de 3 mm et de 1 mm
- Plaques PCR
- Pointes de micropipettes avec et sans filtre

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.

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

Grandeur	EMT
Volume	Volume < à 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ ou se référer à la norme ISO 8655
Température	<p>Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur)</p> <p>Congélateur : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction des recommandations fournisseur</p> <p>Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$</p>

*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 (pipettes, bain-marie, ...), le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissuelyser, Qiagen®) ou matériel équivalent
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage avec un logiciel permettant l'acquisition de fluorescence et l'évaluation automatique des cycles seuil.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus par le laboratoire sont constitués par des lots d'un ou plusieurs kystes de type *Globodera*. Si les kystes sont issus d'une analyse de détection selon la méthode ANSES/LSV/MA019, les échantillons sont constitués par la totalité des kystes détectés comme étant de type *Globodera*.

Les kystes doivent être conditionnés à sec en microtube correctement fermé et identifié.

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

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les microtubes de kystes peuvent être stockés à température ambiante ou au froid positif en attente de l'analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Il n'y a pas d'exigence particulière concernant la conservation des reliquats d'échantillon.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Si le nombre de kystes par échantillon est inférieur ou égal à 10, tous les kystes de l'échantillon sont analysés ; au-delà de 10 kystes présents dans l'échantillon, 3 kystes sont conservés pour un besoin de confirmation éventuel selon la méthode ANSES/LSV/MA054 réalisé au sein du LNR.

Les kystes issus d'un même échantillon sont conditionnés par lot de maximum 50 kystes dans un ou plusieurs microtubes de 1,5 mL contenant au maximum 50 µL d'eau du robinet. Si l'échantillon contient un grand nombre de kystes de nématodes, préparer *a minima* 5 microtubes de 50 kystes.

Laisser les kystes s'hydrater pendant au moins 6 heures.

Remarque : à l'issue de cette étape, les tubes contenant les kystes peuvent être stockés au congélateur (<-10 °C) avant de procéder à la suite de l'analyse.

Remarque : l'analyse peut également être réalisée sur larves (par exemple après un test de viabilité). Dans ce cas, l'analyse est réalisée à partir du point 2 du paragraphe 8.2.

8.2 Extraction des acides nucléiques

1. Broyer les kystes à l'aide d'un piston (après décongélation des microtubes, le cas échéant).
2. Préparer le volume de tampon de lyse selon les préconisations du fournisseur du kit. Mélanger 180 µL de tampon de lyse (ATL) + 20 µL de protéinase K par microtube.
3. Reprendre les microtubes et procéder à une brève centrifugation ; ajouter 200µL de tampon de lyse préparé précédemment dans les microtubes.
4. Ajouter des billes de verre dans chaque microtube (2 billes de 3 mm et quelques billes de 1 mm de diamètre).
5. Réaliser un broyage par agitation à environ 30 coups par seconde pendant environ 40 secondes.
6. Incuber les extraits au moins une heure à environ 56 °C dans un bain thermostaté.
7. Reprendre les microtubes et procéder à une brève centrifugation ; ajouter 200 µL de tampon AL et bien vortexer
8. Incuber environ 10 mn à environ 70°C
9. Reprendre les microtubes et procéder à une brève centrifugation; ajouter 200 µL d'éthanol (96 - 100%) ; bien homogénéiser
10. Transférer le contenu du tube sur la colonne
11. Centrifuger 1 mn à 6000 g
12. Placer la colonne sur un collecteur propre et ajouter 500 µl de tampon AW1
13. Centrifuger 1 mn à 6000 g
14. Placer la colonne sur un collecteur propre et ajouter 500µl de tampon AW2
15. Centrifuger 3 mn à 20000 g
16. Placer la colonne sur un microtube propre et identifié de 1.5 mL et ajouter 100 µL de tampon AE ou d'eau distillée.
17. Incuber quelques minutes à température ambiante puis centrifuger 1 mn à 6000 g.

Les solutions d'ADN ainsi obtenues sont ensuite analysées directement par PCR temps réel ou congelées (< -10 °C) jusqu'à leur analyse.

8.3 Amplification génomique par PCR en temps réel

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais s'agissant d'un réactif critique, le laboratoire doit démontrer que l'utilisation du nouveau consommable conduit aux mêmes résultats. Dans le cadre d'analyses officielles, le laboratoire doit apporter au LNR la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

1. Préparation du mélange réactionnel :

Chaque extrait d'ADN est analysé en duplicat. La composition du mélange réactionnel est décrite dans le tableau suivant :

Réactifs	Concentration Finale (volume final par puits : 20 µL)
Eau Ultra Pure	Qsp 15µL
Pré-mix commercial	1 X
Amorce µsatGr-F	0,5 µM
Amorce µsatGr-R	0,5 µM
Sonde µsatGr-S	0,2 µM
Amorce µsatGp-F	0,5 µM
Amorce µsatGp-R	0,5 µM
Sonde µsatGp-S	0,2 µM

- Distribution du mélange réactionnel à raison de 15 µL par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur).
- Ajout de 5 µL de solution d'ADN à tester dans les puits PCR.
- Amplification

Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant :

Dénaturation initiale	10 min à 95°C	40 cycles
Dénaturation	10 sec à 95°C	
Hybridation - Elongation	50 sec à 60°C*	

*acquisition de la fluorescence en fin d'élongation

9 Résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel.

Pour être prise en compte, la valeur de Ct doit correspondre à une courbe d'amplification de type exponentiel.

9.1 Contrôle de la validité des résultats

9.1.1 Validation de l'amplification

L'amplification est validée pour les organismes cibles recherchés lorsque :

- le témoin négatif de PCR (A-) ne donne pas d'amplification ou bien donne une valeur de $Ct \geq 35$,
- les témoins positifs de PCR (A+) donne une amplification (sur leur canal de lecture respectif) avec une valeur de $Ct < 35$.

9.1.2 Validation de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est validée pour les organismes cibles recherchés lorsque :

- le témoin négatif de processus (E-) ne génère pas d'amplification ou montre une amplification avec une valeur de $Ct \geq 35$,
- le témoin positif de processus (E+) génère une amplification avec une valeur de $Ct < 35$ pour le signal de l'espèce cible intégrée en tant que témoin.

Dans le cas où les résultats d'un ou plusieurs témoins ne sont pas conformes à ceux attendus (définis ci-dessus), l'analyse n'est pas validée et selon la non-conformité observée, toute ou partie de l'analyse est à refaire (MOA 022).

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Analyse des résultats : interprétation

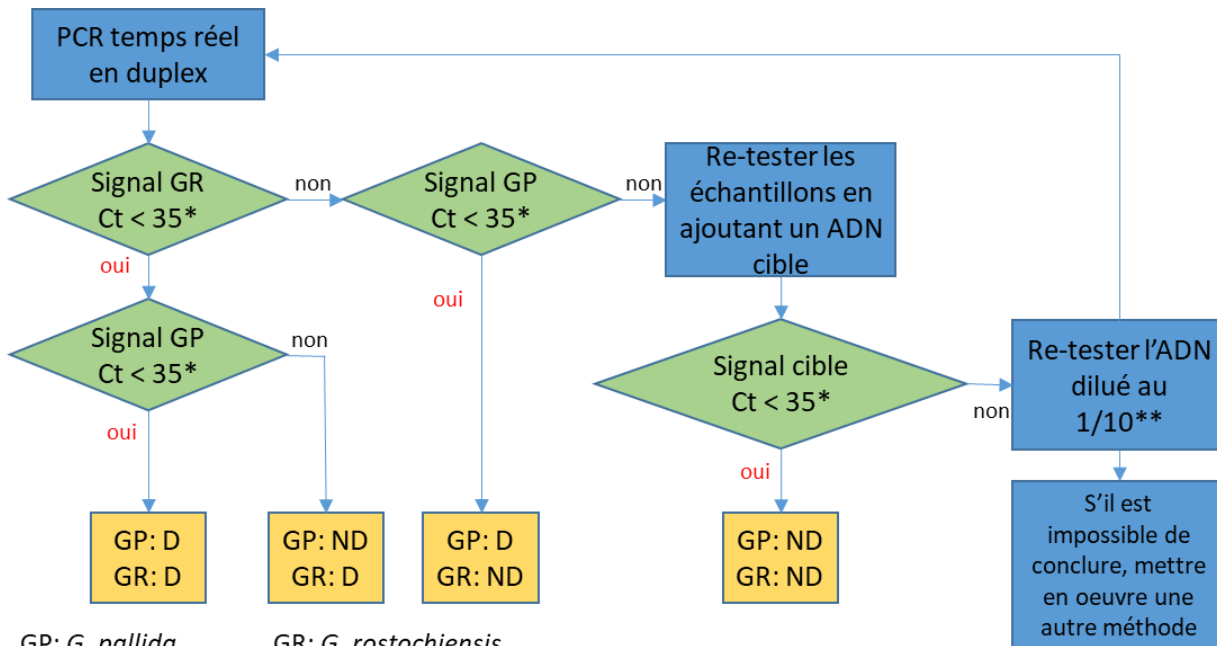
Lorsque la série d'analyses est validée par l'obtention de résultats conformes pour les différents témoins, les résultats des échantillons à analyser peuvent être interprétés de la façon suivante pour les organismes cibles recherchés :

Signal FAM : <i>G. rostochiensis</i>		Signal JOE : <i>G. pallida</i>		Résultats
Puits 1	Puits 2	Puits 1	Puits 2	
+	+	+	+	Positif pour les deux espèces cibles
+	+	-	-	Positif pour <i>G. rostochiensis</i> et négatif pour <i>G. pallida</i>
+	+	+	-	Positif pour <i>G. rostochiensis</i> et re-tester l'ADN en réaction simplex pour <i>G. pallida</i>
-	-	+	+	Négatif pour <i>G.rostochiensis</i> et positif pour <i>G.pallida</i>
+	-	+	+	Positif pour <i>G. pallida</i> et re-tester l'ADN en réaction simplex pour <i>G. rostochiensis</i>
+	-	+	-	Re-tester l'ADN en réaction simplex pour chaque espèce
-	-	+	-	Re-tester l'ADN en réaction simplex au moins pour <i>G. pallida</i>
+	-	-	-	Re-tester l'ADN en réaction simplex au moins pour <i>G. rostochiensis</i>
-	-	-	-	<p>Re-tester les échantillons en ajoutant un ADN cible dans le mélange réactionnel (= Témoin d'inhibition TI).</p> <p>Si TI est positif (+) pour l'ADN cible considéré, le résultat de l'échantillon (microtube) est <u>négatif pour <i>G. pallida</i> et <i>G. rostochiensis</i>.</u></p> <p>Si TI est négatif (-) pour l'ADN cible considéré, une nouvelle PCR est mise en œuvre en diluant au 1/10 l'ADN des échantillons négatifs.</p> <p>S'il est impossible de conclure pour tous les tubes d'un même échantillon, mettre en œuvre une autre méthode (morphologie combinée à la PCR conventionnelle).</p>

+: observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 35. Les échantillons fournissant des valeurs de Ct ≥ 35 et une courbe d'amplification exponentielle en réaction en duplex doivent être re-testés en réaction en simplex.

- : absence de courbe de fluorescence exponentielle ou observation d'une courbe qui n'est pas exponentielle ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct ≥ 35 en réaction en simplex.

Le logigramme suivant présente le schéma décisionnel de la méthode d'analyse :



GP: *G. pallida*

GR: *G. rostochiensis*

D: détecté ND: non détecté

* Ct < 35 et courbe d'amplification exponentielle observée

** S'il est impossible de rendre un résultat final, de nouveaux kystes sont analysés selon un autre protocole, soit à partir du reliquat de kystes soit après une nouvelle extraction de la matrice.

En cas d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct > 35, il est recommandé de re-tester l'ADN en réaction simplex.

9.2.2 Formulation du résultat d'analyse

Le résultat final de l'analyse combine les résultats des différents microtubes obtenus pour un même échantillon ainsi que les résultats sur les deux canaux de lecture de fluorescence. Il est exprimé sous forme qualitative du type :

***G. pallida* détecté ou non détecté**

***G. rostochiensis* détecté ou non détecté**

10 Caractéristiques de performance de la méthode

D'après le rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection par PCR temps réel de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* (document de référence [3]), les caractéristiques de performance de la présente méthode d'analyse sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Performance de la méthode évaluée
Sensibilité analytique / Seuil de détection	10 J2 de <i>G. pallida</i> en mélange avec 50 kystes* de <i>G. rostochiensis</i> 1 kyste de <i>G. rostochiensis</i> en mélange avec 49 kystes* de <i>G. pallida</i> (10 J2 de <i>G. rostochiensis</i> en mélange avec 50 kystes* de <i>G. pallida</i> <u>en simplex</u>) *contenant approximativement 250 larves par kyste
Sensibilité analytique -Inclusivité / Sensibilité relative	100 %
Spécificité analytique - Exclusivité/ Spécificité relative	100 %
Exactitude / Justesse	100 %
Répétabilité / Fidélité (au seuil de détection)	100 %
Reproductibilité (au seuil de détection)	100 %

Bibliographie

Gamel, S., Letort, A., Fouville, D., Folcher, L., & Grenier, E. (2017). Development and validation of real-time PCR assays based on novel molecular markers for the simultaneous detection and identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* and *Heterodera schachtii*. *Nematology*, 19(7), 789–804. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003086>.