

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA004 – version 2

février 2018

# Détection des phytoplasmes responsables de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du déperissement du poirier

**Laboratoire de la santé des végétaux**

Laboratoire national de référence « Phytoplasmes 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
va		Juin 2005	Version initiale (initialement codifiée sous VL/05/12/version a)
v1a	mineures	Juin 2010	Codifiée sous MOA 004 version 1a <ul style="list-style-type: none"><li>Mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes ;</li><li>Retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans un glossaire général ;</li></ul>
v1b	mineures	Juillet 2013	Codifiée sous MOA 004 version 1b ; <ul style="list-style-type: none"><li>Modification de la concentration en CTAB 3% au lieu de 2% ;</li><li>Suppression du couple d'amorces R16R2/R16F2, non évalué lors des essais ;</li><li>Modification de la concentration finale en DNA polymérase dans le master mix pour 1 U/μL au lieu de 0,6 U/réaction.</li><li>Précisions quant aux points critiques notamment liés aux risques de microcontaminations ;</li><li>Précisions sur le respect des conditions de digestion enzymatique prescrit par le fournisseur ;</li><li>Précisions sur le profil de restriction enzymatique.</li></ul>
v2	mineures		<ul style="list-style-type: none"><li>Mise en forme de la méthode selon un format harmonisé commun à l'ensemble des méthodes de l'ANSES;</li><li>Ajout d'une introduction sur les phytoplasmes des arbres fruitiers</li></ul>

\* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 04 décembre 2017 au 04 janvier 2018 sur le site internet de l'agence.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de virologie des plantes, Bordeaux) en 2005.

La présente méthode est une actualisation de la MOA 004 version 1b, détection de l'enroulement chlorotique de l'abricotier, de la prolifération du pommier et du dépérissement du poirier sur rameaux. Cette méthode a été revue et évaluée par :

### **Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Bactériologie, Virologie, OGM**

Laboratoire National de Référence (LNR) dans le domaine de compétence « phytoplasmes sur toutes matrices »

Adresse :

7 rue Jean Dixméras

49044 ANGERS Cedex 01

France

Tèl. : +33(0)2.41.20.74.20

Contact : [angers.lsv@anses.fr](mailto:angers.lsv@anses.fr)

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (Janvier 2013). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par l'unité « Développement de méthodes et analyses » 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 Tampons .....	10
5.3 Oligonucléotides .....	10
5.4 ADN polymérase .....	11
5.5 Tampon de l'ADN polymérase .....	11
5.6 Enzymes de restriction Alu1 ou Rsa1 .....	11
5.7 Autres consommables à usage unique .....	11
5.8 Contrôles .....	11
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>12</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	13
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>13</b>
8.1 Préparation des échantillons pour analyse .....	13
8.2 Broyage et extraction d'ADN total .....	13
8.3 Test de détection par PCR point final .....	14
8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR .....	14
8.3.2 Amplification par PCR .....	15
8.4 Digestion des amplifiats (RFLP) .....	15
<b>9. Résultats</b> .....	<b>16</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	16



9.2 Expression des résultats.....	16
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>18</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>19</b>



## Introduction

Il existe trois maladies importantes du verger français dues à des phytoplasmes du groupe 16 SrX\*:

- la maladie de la prolifération du pommier ou Apple Prolifération (AP) associée à '*Candidatus Phytoplasma mali*';
- la maladie du dépérissement du poirier ou Pear Decline (PD) associée à '*Candidatus Phytoplasma pyri*';
- la maladie de l'enroulement chlorotique de l'abricotier ou European Stone Fruit Yellows (ESFY) associée à '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'.

La maladie de la prolifération du pommier attaque pratiquement tous les cultivars de pommier, en réduisant la taille (d'environ 50%), le poids (de 63-74%) et la qualité des fruits.

Le dépérissement du poirier représente la plus grave maladie de dégénérescence du poirier. Elle est présente de façon sporadique en France. La floraison reste abondante mais les fleurs sont de mauvaise qualité et la mauvaise nouaison entraîne une chute importante des fruits.

La maladie de l'enroulement chlorotique de l'abricotier est une des maladies causant le plus de dégâts sur les arbres fruitiers à noyaux, en particulier l'abricotier et le pêcher. La maladie est connue en France depuis 1920, pour provoquer des apoplexies sur abricotier.

\*groupe 16 Sr X selon la classification de Lee *et al.* 1998a ; Davis and Dally, 2001 ; Montano *et al.*, 2001.



## **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.**

**Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit prendre en compte les risques phytosanitaires et mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.**



## 1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence des phytoplasmes du groupe 16SrX, responsable la prolifération du pommier (Apple proliferation phytoplasma – '*Candidatus* Phytoplasma mali'), l'enroulement Chlorotique de l'Abricotier (European Stone fruit yellows ; Apricot chlorotic leafroll phytoplasma ; Peach chlorotic leafroll phytoplasma – '*Candidatus* Phytoplasma prunorum') et le dépérissement du poirier (Pear decline phytoplasma – '*Candidatus* Phytoplasma pyri') à partir du phloème prélevé sous l'écorce des rameaux des arbres (*Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia*) présentant ou non des symptômes.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter les phytoplasmes du groupe 16SrX mais pas de les quantifier dans l'échantillon analysé. Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de phytoplasmes ou contaminés 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 contaminés par les phytoplasmes du groupe 16SrX.

Ce test s'appuie sur une extraction d'ADN suivi d'une PCR point final puis d'une digestion enzymatique dans le cas d'une réponse positive à la PCR pour les végétaux du genre *Prunus*.

## 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.
- [2] GLO 001- Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV.
- [3] Leguay A., Loiseau M., janvier 2013. Rapport d'évaluation des méthodes de détection des phytoplasmes des arbres fruitiers.

## 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...).

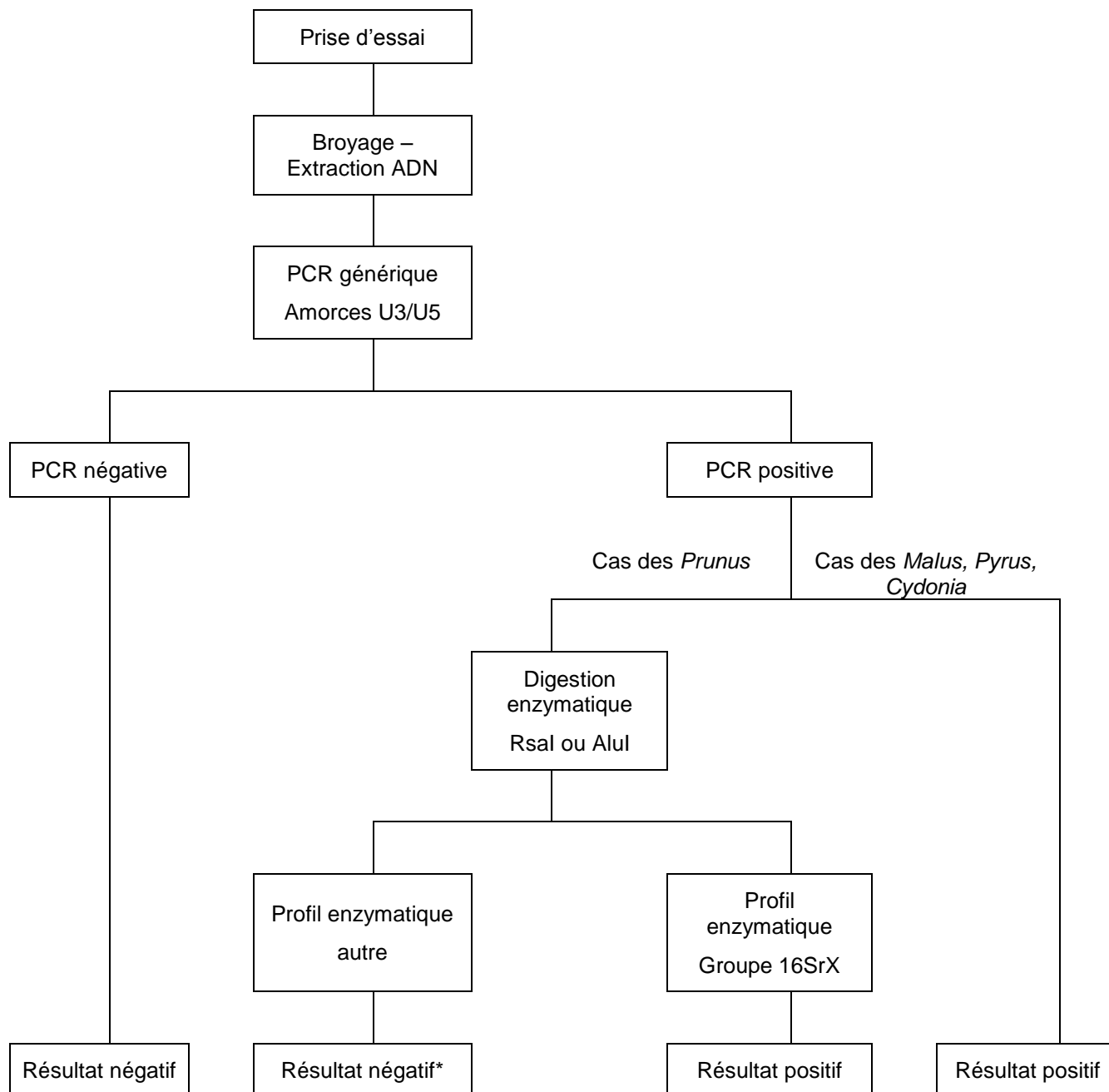
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.





## 4. Principe de la méthode

La méthode est présentée dans le schéma ci-dessous :



\* En commentaire, le laboratoire devra indiquer « Un phytoplasme n'appartenant pas au groupe 16SrX a été détecté mais non identifié ».



## 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 interférer sur le résultat.

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

### 5.1 Eau

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

### 5.2 Tampons

La liste des solutions et tampons nécessaires à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- tampon de broyage CTAB (3%) ;
- solution chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) ;
- solution d'éthanol 70% ;
- tampon d'électrophorèse TBE (Tris Borate EDTA) ;
- tampon de charge.

Les solutions et tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs.

Le laboratoire peut aussi fabriquer certains tampons ou certaines solutions. Pour cela, le laboratoire se référera au répertoire des recettes en vigueur (REP-001).

Les préparations de tampon et solutions et leur durée et conditions de conservation doivent en tout point être conformes aux recommandations du fournisseur ou au répertoire des recettes le cas échéant.

### 5.3 Oligonucléotides

#### Amorces U3 et U5 (détection des phytoplasmes tous groupes confondus)

Nom	Séquence	Longueur
U3 (Lorenz <i>et al.</i> , 1995)	5' – TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA – 3'	20 bases
U5 (Lorenz <i>et al.</i> , 1995)	5' – CGG CAA TGG AGG AAA CT – 3'	17 bases

Taille du fragment amplifié : 876 paires de bases.



Ces amorces sont sensibles aux successions de phases de congélation-décongélation, il est recommandé de préparer des aliquotes et de les garder au congélateur.

#### 5.4 ADN polymérase

L'ADN polymérase utilisée pour la validation de cette méthode est l'AmpliTaq<sup>®</sup> DNA polymerase de la société Applied Biosystems<sup>®</sup>.

Les différentes formes commercialisées d'ADN polymérase présentent des profils d'activité très différents, il est donc recommandé de s'assurer de leur efficacité.

#### 5.5 Tampon de l'ADN polymérase

Il est obligatoire d'utiliser le tampon de polymérase fourni avec cette dernière par le fabricant.

#### 5.6 Enzymes de restriction Alu1 ou Rsa1

Préparer le milieu réactionnel de la restriction conformément aux préconisations du fournisseur.

#### 5.7 Autres consommables à usage unique

- Scalpel ou tout autre matériel permettant le grattage des échantillons.
- Sachets de broyage ou tout autre matériel dans lequel le broyage peut être réalisé.
- Contenants pour conservation des solutions préparées.
- Pointes à filtre adaptées aux micropipettes pour volumes 0,5 à 1000 µL.
- Microtubes (si possible de 1,5 mL à fond conique et de 2 mL à fond rond).
- Microtubes ou plaques adaptés au thermocycleur du laboratoire.

L'utilisation de plastique (pointes, tubes...) de type « DNase-free » est également pertinente.

#### 5.8 Contrôles

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR inclut l'utilisation d'une série de témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces 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),
- il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

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

- un contrôle positif de processus (E +) : tissu de végétal, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclaré « contaminé » à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle négatif de processus (E -) : tissu de végétal, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclaré « non contaminé » à l'issue de la manipulation ;
- un contrôle positif d'amplification (A +) : solution d'acides nucléiques cibles donnant lieu à une amplification ;
- un contrôle négatif d'amplification (A -) solution ne contenant pas d'acide nucléique cible (Mix+eau) ne donnant pas lieu à une amplification ;



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

## 6. Appareillage et matériels

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

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

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

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

Grandeur	EMT
Volume	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	<b>Incubateur</b> : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ <b>Réfrigérateur</b> : $5^{\circ}\text{C}$ et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ <b>Congélateur</b> : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ <b>Thermocycleur*</b> : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

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

L'utilisation d'une presse pneumatique pour le broyage (de type « PCN125A 50S » de chez Joucomatic) dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon a donné des résultats satisfaisants dans les conditions de travail du LNR et est recommandé. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations.

Cette méthode a été évaluée avec le thermocycleur « Veriti<sup>®</sup> » de la société Applied Biosystems<sup>®</sup>. Tout appareil équivalent possédant des caractéristiques comparables peut être utilisé.

## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons doivent arriver frais au laboratoire : bois sans nécrose ou signe de dessèchement.



## 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Dans la mesure du possible, les prises d'essai doivent être réalisées le jour de la réception. Les échantillons sont pesés puis conservés à 5°C jusqu'au jour de l'analyse.

Les différentes prises d'essai peuvent être conservées jusqu'à 6 mois au congélateur avant analyse.

## 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité.

Les échantillons sont stockés à 5°C dans un sac en plastique hermétique avec un fond d'eau pendant quelques semaines maximum.

**Il est recommandé de préparer un sachet supplémentaire, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation.**

Après extraction d'ADN, les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, 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.

Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

## 8. Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

L'échantillon est écorcé à l'aide d'un scalpel et gratté afin d'obtenir des copeaux de phloème.

1 à 1,5 g de ces copeaux est récupéré pour constituer l'échantillon d'analyse.

### 8.2 Broyage et extraction d'ADN total

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de l'homogénéiser et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.

1. Déposer 5 à 10 mL de tampon de broyage CTAB 3% (éventuellement chaud) pour 1 à 1,5 g d'échantillon. Broyer. Déposer 1 à 2 mL de broyat dans un microtube de 2 mL.

*Remarque : A ce stade, il est possible d'ajouter sous la hotte aspirante, 2 µL de β-mercapto éthanol (concentration finale environ 0,2 %). Celui-ci permet d'améliorer le rendement d'extraction et a une activité anti-oxydante.*

2. Incuber les microtubes à environ 65 °C pendant 30 min minimum afin de permettre la dénaturation par le CTAB. Centrifuger pour clarifier le broyat (2 000 g minimum, 2 à 5 min.).



3. Prélever 1 mL au maximum de surnageant dans un microtube de 2 mL.
4. Sous hotte aspirante, ajouter 1 V/V de solution de chloroforme / alcool iso-amylque (ratio 24/1) au surnageant. Agiter par retournement pour provoquer une émulsion (chloroforme insoluble).
5. Centrifuger 5 min minimum entre 12 000 et 14 000 g. Prélever la phase supérieure dans un microtube en s'assurant de ne pas prélever des éléments de l'interphase.
6. Ajouter 0,6 à 1 V/V d'isopropanol froid dans le surnageant(\*). Mélanger brièvement par retournement manuel, puis centrifuger à 13 000 g minimum pendant 10 min minimum pour précipiter les acides nucléiques.

(\*L'extraction peut être stoppée à cet instant. Il suffit de conserver les tubes remplis d'isopropanol au congélateur. Le temps de conservation de l'ADN sous cette forme peut être de plusieurs mois.

7. Éliminer délicatement le surnageant, attention à ne pas perdre le culot d'ADN (parfois un contrôle visuel est possible).
8. Laver le culot avec environ 800 µL d'éthanol à 70%. Mélanger.
9. Centrifuger de façon à bien recoller le culot au fond du tube pour faciliter l'élimination du surnageant (12 000 à 13 000 g pendant environ 5 minutes donne satisfaction). Jeter le surnageant
10. Bien sécher le culot pour éviter toute trace d'alcool (étuve, SpeedVac ...)
11. Déposer 100 µL d'eau ultra-pure. Vortexer puis laisser solubiliser.

Les suspensions d'ADN peuvent être conservées plusieurs jours au réfrigérateur à plusieurs mois au congélateur.

### 8.3 Test de détection par PCR point final

#### 8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel de PCR

Un exemple de la composition du mélange réactionnel (volume réactionnel : 35 µL de Mix et 5µL d'extrait d'ADN) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 35 µL
Tampon de polymérase à ADN avec MgCl <sub>2</sub> fourni avec la polymérase à ADN	1 X
BSA	0,05% (50 µg/mL)
Amorce U3	0,5 µM
Amorce U5	0,5 µM
dNTPs mix	250 µM
Polymérase à ADN (fournie à 5 U/µL)	1 U

**Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN**



Dans l'exemple, le  $MgCl_2$  est inclus dans le tampon 10X du fournisseur. **Pour l'utilisation des réactifs, se conformer aux spécifications du fournisseur.**

Un minimum de 2 puits par échantillon est déposé.

### 8.3.2 Amplification par PCR

Les différents paramètres de la PCR point final pour la détection des phytoplasmes sont les suivants :

#### Cycle d'amplification

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale	94 °C	2 min	1
2	Dénaturation	94 °C	20 s.	40
	Hybridation	55 °C	20 s.	
	Polymérisation d'ADN	72 °C	1 min	
3	Elongation finale	72 °C	4 min	1

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont conservés au froid jusqu'à leur dépôt sur gel d'électrophorèse.

Après électrophorèse, les amplifiats sont visualisés selon les modalités en vigueur dans le laboratoire. La présente méthode a été validée avec le bromure d'éthidium comme agent intercalant.

### 8.4 Digestion des amplifiats (RFLP)

Cette étape permet la détermination du groupe du phytoplasme détecté sur les échantillons positifs de *Prunus* par digestion enzymatique (enzymes de restriction Alu1 ou Rsa1).

Préparer le milieu réactionnel de la restriction conformément aux préconisations du fournisseur.

Déposer chaque amplifiât à digérer dans un contenant adapté (plaque ou tube PCR) et y ajouter la quantité de milieu réactionnel préconisée par le fournisseur.

Exemple de composition du mélange réactionnel pour la digestion enzymatique:

Eau Ultra Pure	qsp 20 µL
Tampon 10X (sans BSA)	1 X
BSA	1 µg/µL
Rsa 1	0,5 U
amplifiat	13 µL
<b>Volume réactionnel</b>	<b>20 µL</b>



*Remarque : La quantité réelle de BSA nécessaire par échantillon est trop infime pour pouvoir être prélevée correctement. Un excès n'étant pas préjudiciable, pour un petit nombre d'échantillons (inférieur à 10) prévoir le volume minimal de pipetage (environ 0,2 µL).*

Laisser incuber une nuit (ou 4 heures minimum) à 37°C.

### **Dans tous les cas, se conformer aux spécifications du fournisseur.**

Séparer les bandes par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2 ou 3% (l'utilisation d'une échelle de taille moléculaire comportant des fragments de tailles multiples de 100 paires de bases est recommandée).

Suivant le profil obtenu à l'issue de la digestion, le phytoplasme est déclaré appartenant au groupe 16Sr X ou à un autre groupe de phytoplasmes.

## **9. Résultats**

### **9.1 Contrôle de la validité des résultats**

L'analyse PCR est validée lorsque :

- la référence poids moléculaire est visible,
- il y a présence d'une bande d'amplification d'environ 880 pb (U3/U5) au niveau des témoins positifs (extraction et PCR),
- il y a absence d'amplification au niveau des témoins négatifs.

### **9.2 Expression des résultats**

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue. Un échantillon est déclaré infecté par un phytoplasme lorsqu'une bande d'amplification visible apparaît à la position attendue.

Pour les échantillons de **Malus ou Pyrus**, la présence de phytoplasme est suffisante pour déclarer l'échantillon positif (tous les phytoplasmes sur ces espèces étant réglementés). Le résultat peut être formulé comme suit :

- « Résultat négatif pour la détection de '*Candidatus Phytoplasma mali*' ou '*Candidatus Phytoplasma pyri*' » dans le cas d'un résultat négatif ;
- « Résultat positif pour la détection de '*Candidatus Phytoplasma mali*' ou '*Candidatus Phytoplasma pyri*' » dans le cas d'un résultat positif.

Pour les échantillons de **Prunus**, la digestion enzymatique (Alu1 ou Rsa1) doit être réalisée pour différencier les phytoplasmes du groupe 16Sr X (réglementés) des autres groupes de phytoplasmes.





### Taille des principaux fragments obtenus (en pb)

Phytoplasmes des arbres fruitiers		AP 16SrX	ESFY 16SrX	PD 16SrX	16SrI	'Ca. P. aurantifolia' 16SrII-B	'Ca. P. pruni' 16SrIII	16SrV	16SrIX	'Ca. P. brasiliense' 16SrXV
Taille des Fragments attendus à partir des séquences obtenues après amplification avec les amorces U5/U3 (pb)	Rsa I	449	392	449				450		
		363	363	363	337	366	366	365	400	366
	Alu I	44	58	44	293	337	337		366	337
		44	44	44	73, 57, 55	65	63		49	65
		476	476	476	44	49	685	683	627	685
		189	189	189	352				685	685
		151	151	151	275	191	191	247	191	191
		56	56	56	191					
					56					

**ESFY (ECA) : European stone fruit yellows = 'Candidatus Phytoplasma prunorum'**

**AP : Apple proliferation = 'Candidatus Phytoplasma mali'**

**PD : Pear decline = Peach yellow leafroll phytoplasma = 'Candidatus Phytoplasma pyri'**

**Groupe 16Sr I : groupe des aster yellows**

Attention : Avec RsaI, des profils proches à celui de 'Ca. P. prunorum' sont obtenus pour les phytoplasmes du groupe 16SrII-B 'Ca. P. aurantifolia' (Lime Witches'broom), du groupe 16SrIII 'Ca. P. pruni', du groupe 16SrXV, 'Ca. P. brasiliense' (Surinam virescence) et du groupe 16SrIX. En effet, pour 'Ca. P. prunorum', les 2 principaux fragments attendus sont de 392 et 363 pb tandis que pour les 3 premiers phytoplasmes précités, les fragments attendus sont de 366 et 337 pb et pour les phytoplasmes du groupe 16SrIX, les fragments attendus sont de 400 et 366 pb.

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant pas le profil électrophorétique attendu. Le test est positif pour les échantillons présentant le profil électrophorétique attendu. Le résultat peut être formulé comme suit :

- « Résultat négatif pour la détection de 'Candidatus Phytoplasma prunorum' » dans le cas d'un résultat négatif ;
- « Résultat positif pour la détection de 'Candidatus Phytoplasma prunorum' » dans le cas d'un résultat positif.



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-dessous est extraite du rapport de validation de méthode d'analyse établi par le LNR (Janvier 2013). Les caractéristiques des performances pour cette méthode sont les suivantes :

Caractéristique	Détection de		
	'Ca. P. mali'	'Ca. P. prunorum'	'Ca. P. pyri'
Sensibilité	97,44%	100%	96,67%
Spécificité	92,31%	91,67%	100%
Exactitude	94,87%	95,83%	98,31%
Répétabilité	98,31%	100%	97,80%
Seuil de détection*	$1.10^{-4}$	$1.10^{-4}$	$1.10^{-5}$

\* Le seuil de détection correspond à un niveau de dilution d'un ADN d'échantillon contaminé dans de l'ADN d'échantillon sain.



## Bibliographie

- 1) **Ahrens, U.**, and Seemüller, E. **1992**. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82 :828-832.
- 2) **Gundersen, D.E.** and Lee, I.M., **1996**. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pair. *Phytopathology Mediterranean* 35: 144-151.
- 3) **Lee I.-M.**, Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., **1993**. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83 (8), 834-842.
- 4) **Lee I.-M.**, Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E. and Bartoszyk I.M., **1998**. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal Systematic Bacteriology*. 48, 1153-1169.
- 5) **Levy, L.**, Lee, I. M., and Hadidi, A. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid and MLO nucleic acids. *J Virol. methods* 49 :295-304.
- 6) **Lorenz K.H.**, Schneider B., Ahrens U. and Seemüller E., **1995**. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*. 85, 771-776.
- 7) **Schneider, B.**, Seemüller, E., Smart, C. D. and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in mycoplasmaology*. Vol. 1. :369-380. Eds Academic Press, San Diego, CA.
- 8) **Roberts R.J.**, Vincze T., Posfai J., Macelis D., **2010**. RESBASE-a data base for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 38, 234-236.