

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 041- Version 01

21/12/15

Détection de *Phyllosticta citricarpa* par la technique de PCR en temps réel



Laboratoire de la Santé des Végétaux
Laboratoire national de référence « Champignons phytopathogènes sur toute matrice »



Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1			Version initiale
v2			
vx			



Avant-propos

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

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : jacqueline.hubert@anses.fr

La présente méthode a été mise au point par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

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 Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium titrant au moins 1.5 % de chlore actif [produit corrosif à manipuler avec précaution].	9
5.3 Kits d'extraction d'ADN de plante.....	9
5.4 Oligonucléotides.....	9
5.5 Kit d'amplification pour PCR en temps réel.....	9
5.6 Autres consommables à usage unique.....	10
5.7 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	12
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	12
8 Mode opératoire.....	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	13
8.3 Test de détection par PCR en temps réel.....	14
9 Résultats.....	15
9.1 Contrôle qualité	15
9.2 Calculs et expression des résultats	16
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Annexe 1 : Symptômes de <i>P. citricarpa</i> sur <i>Citrus sinensis</i>	21
Annexe 2 : Symptômes de <i>Phyllosticta citriasiana</i> et de <i>Colletotrichum sp.</i>	22
Annexe 3 : Schéma décisionnel.....	23
Bibliographie.....	24



Introduction

Le champignon *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alpine) Van der Aa (anciennement *Guignardia citricarpa* Kiely), agent de la maladie des taches noires, est un pathogène important des agrumes. Il a été recensé officiellement pour la première fois, en Australie, en 1895, aux environs de Sydney (Kiely, 1949a). *P. citricarpa* est actuellement présent dans de nombreuses régions agrumicoles mais ne s'est jamais établi en Europe. La maladie des taches noires attaque les feuilles, les rameaux et plus particulièrement les fruits, affectant les genres *Citrus* (à l'exception de *Citrus aurantium* et ses hybrides et de *Citrus latifolia*), *Poncirus*, *Fortunella* spp. et leurs hybrides. Elle provoque des lésions sur la peau des fruits qui les excluent du marché des fruits frais. Ces lésions (cf. annexe 1) sont d'apparence variable et peuvent être visuellement confondus avec des symptômes provoqués par d'autres pathogènes fongiques comme *Phyllosticta citriasiana*, *P. citrichinaensis* ou *Colletotrichum* spp (cf. annexe 2), par des insectes, ou par des lésions mécaniques ou causées par le froid.

Cette méthode qualitative permet de détecter la présence de *Phyllosticta citricarpa* dans des tissus végétatifs par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.



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 nationale en vigueur.

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

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

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

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

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

Conservation des reliquats de matériels utilisés :

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

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



1 Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Phyllosticta citricarpa* sur fruits symptomatiques de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et leurs hybrides. La présence de *P. citricarpa* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sonde d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *P. citricarpa* dans la limite du seuil de détection des techniques employées sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *P. citricarpa* ou contaminé à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode concerne les végétaux de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et leurs hybrides.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Cette méthode est validée sur fruits de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et leurs hybrides.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur écorce de fruits de *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et leurs hybrides présentant des symptômes.

2 Documents de référence

- [1] **Décret 2006-7 du 4 janvier 2006** relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural
- [2] **Arrêté ministériel du 19 décembre 2007** fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux XXX
- [3] **MOA 022** : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

3 Termes, sigles et définitions

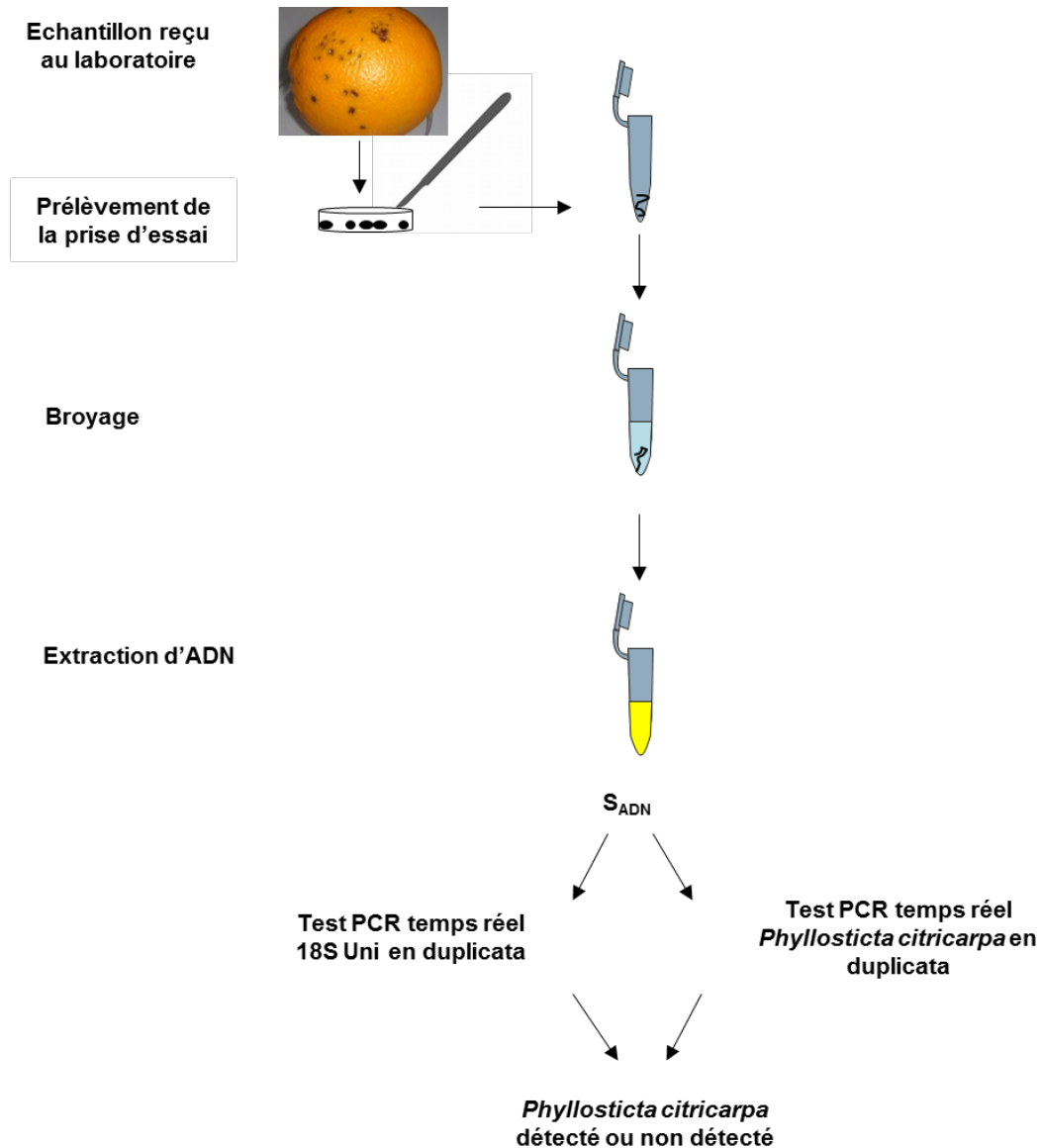
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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 le schéma ci-dessous :



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. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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 seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera optimales.

5.1 Eau

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

5.2 Eau de Javel ou solution d'hypochlorite de Sodium titrant au moins 1.5 % de chlore actif [produit corrosif à manipuler avec précaution].

5.3 Kits d'extraction d'ADN de plante

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal et ADN de microorganismes présent sur le prélèvement) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), en utilisant le tampon de lyse AP1 fourni par le fabricant (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005).

5.4 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>P. citricarpa</i>	Gc-F1 ^a	GGT GAT GGA AGG GAG GCC T
	Gc-R1 ^a	GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT
	Gc-P1 ^a	[FAM]-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a Van Gent Pelzer *et al.* (2007)

^b loos *et al.* (2009)

Les sondes marquées, sous forme concentrée ou diluée, sont conservées à l'obscurité et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière (risque de photolyse). Eviter de trop fréquents cycles de congélation/décongélation, par exemple en préparant des parties aliquotes à nombre d'utilisations limité. D'autres fluorophores rapporteurs compatibles avec le thermocycleur peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.5 Kit d'amplification pour PCR en temps réel

Le kit d'amplification initialement validé pour cette méthode est le Mastermix No Rox (Eurogentec) (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005).



5.6 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR en temps réel de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Tubes de lysing matrix A 2 mL (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente (cf **Dossier LNR de validation de la méthode MIAM005**).

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 est associée à l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que

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

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

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le parasite cible ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une autre réaction que le test de détection de *P. citricarpa*. L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (écorces de *Citrus spp.*) dans ses propres conditions.
Dans les conditions de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 15,5 (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005).
- **Un témoin négatif d'extraction ($T_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide", c'est-à-dire un microtube de 2 mL stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai- broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux



positif) et sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel Gc-F1/-R1/-P1 pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de T_{-extr} doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation d'échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.

- **Un témoin positif T_{+18S Citrus}** sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T_{+18S Citrus} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR 18S uni-F/-R/-P obtenue à partir d'ADN d'écorce de *Citrus* sp. ou d'une solution d'ADN d'écorce de *Citrus* sp. à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.
 - **Un témoin positif en limite pratique de détection (T_{+LOD})** sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel Gc-F1/-R1/-P1. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *P. citricarpa* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *P. citricarpa* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR Gc-F1/-R1/-P1. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions.
Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été estimée à 4,84.10³ copies plasmidiques de cible par tube de PCR (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005).
- Par ailleurs, le Ct moyen généré par cette concentration de T_{+LOD} (Ct_{LOD}) correspond à la valeur maximale acceptable pour déclarer un extrait d'ADN (S_{ADN}) positif au test (cf. **dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005**). Au-delà de cette valeur, des manipulations complémentaires devront être entreprises (cf. §9.2.)
- **Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control)** sera systématiquement introduit en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel Gc-F1/-R1/-P1. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des S_{ADN} dans les tubes individuels de PCR (2^{ème} type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la norme AFNOR XP V03-043 et la MOA 022.

L'utilisation de ces contrôles et témoins permet de substituer les contrôles métrologiques classiques (volumes, pH, résistivité, température, certificats, etc.), l'interprétation des résultats obtenus avec les différents types de contrôles et témoins permet de valider ou non *a posteriori* l'ensemble du matériel, des consommables, de la manipulation et des résultats. En revanche, il est recommandé d'effectuer un minimum de maintenance des appareils utilisés et de garantir un minimum de traçabilité des consommables utilisés pour pouvoir réagir en cas de problème ou de non-validation de manipulation. L'homogénéité des thermocycleurs comprenant un bloc à puits doit en outre être vérifiée, lorsque ce type de machine est utilisé.



6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

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

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6000, Corbett Research (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 005).
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés) ou à défaut des zones séparées physiquement.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biochemicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse :

Les échantillons sont constitués d'au moins un fruit présentant des symptômes (cf. Annexe 1). Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis :

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

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

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Après réception au laboratoire, l'échantillon peut être stocké avant analyse. Il doit alors être conservé à 5°C ±3°C.



8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

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.

La prise d'essai se réalise de préférence sous hotte permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles. Chaque échantillon est traité individuellement.

Le tube faisant office de témoin négatif d'extraction est placé ouvert sur le poste de travail avant la manipulation des échantillons pour prise d'essai et refermé en fin de prélèvement.

La prise d'essai s'effectue sur des fruits présentant des symptômes typiques d'une infection par *P. citricarpa* ou éventuellement des symptômes douteux (cf. annexe 1 : Symptômes de *Phyllosticta citricarpa*). Les prélèvements sur écorce de fruit s'effectuent sur les lésions observées en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite. Les fragments de lésions sont ensuite découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée, en tronçons les plus petits possible (environ 2 à 3 mm d'arête). Ces tronçons sont ensuite mélangés puis transférés dans un microtube de lysing matrix A, en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ le 1/4 du tube. A cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de tronçons, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence. Les différentes prises d'essai peuvent être conservées jusqu'à 6 mois au congélateur avant analyse. Après extraction d'ADN les extraits peuvent être conservés congelés pendant 1 an.

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

Les opérations décrites ci-dessous s'effectuent en portant des gants à usage unique non talqués. La paire de gants doit être systématiquement changée au moindre contact direct avec la prise d'essai.

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

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. **Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai**, centrifuger brièvement le microtube afin de précipiter toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser les capuchons de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage d'ADN au spectrophotomètre est prévu, il



sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).

4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur Fastprep et broyer environ 1 minute à 6,5 unités. Recommencer cette étape une deuxième fois.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre le broyat au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube entre 15 et 20 minutes à environ 65°C (ou à température préconisée par le fabricant de kits d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à précipiter.
7. Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant, après avoir brièvement centrifugé les tubes afin de limiter les risques de projection à leur ouverture.
8. À la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans le volume final de tampon d'éluion recommandé par le fabricant (100 µL). Cette solution d'ADN total (S_{ADN}) constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel.

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection Gc-F1/-R1/-P1

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 µL) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
Mastermix no Rox (Eurogentec)*	1x
Amorce sens Gc-F1	0.3 µM
Amorce antisens Gc-R1	0.3 µM
Sonde Gc-P1	0.1 µM

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

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL,
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µL par microtube.

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

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



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

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel Gc-F1/-R1/-P1

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *P. citricarpa* sont les suivants (adaptés de Van Gent-Pelzer *et al.*(2007)) :

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

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

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

Test de contrôle qualité d'ADN par PCR en temps réel 18S uni-F/-R/-P

Ce test est réalisé en parallèle du test de détection de *P. citricarpa*. La composition du mélange réactionnel est identique à celle indiquée pour la recherche de *P. citricarpa*, en substituant simplement les amorces et la sonde **Gc-F1/-R1/-P1** par les amorces et la sonde **18S uni -F/-R/-P**. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *P. citricarpa*, mis à part le nombre de cycles nécessaire fixé à 30.

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

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



L'opérateur détermine une ligne de seuil (« threshold line ») qui constituera la limite minimale de fluorescence « FAM » à atteindre pour qu'un signal de fluorescence émis soit significativement supérieur au signal du bruit de fond (représenté par la « base line »). La ligne de seuil se place en général à un niveau de fluorescence au moins 10 fois supérieur à celui généré par le bruit de fond et où les réplicats du T_{+LOD} sont les plus proches les uns des autres. Le cycle théorique estimé à partir duquel le niveau de fluorescence généré par un échantillon franchit cette ligne seuil avec une nature exponentielle correspond au C_t .

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

- a) Aucun des réplicats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel et l'ajout des S_{ADN} .
- b) Aucun des réplicats de T_{-} (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel et l'ajout des S_{ADN} .
- c) Les réplicats de T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *P. citricarpa*.

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

9.2 Calculs et expression des résultats

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

Pour chacune des réactions de PCR, observer le C_t moyen du contrôle $T_{+LOD} = C_{tLOD}$:

- i) les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le C_t moyen est inférieur ou égal à C_{tLOD} seront considérés comme positifs.
 - ii) les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le C_t moyen est supérieur à C_{tLOD} , avec une augmentation de fluorescence de nature exponentielle, seront considérés comme positifs ou négatifs après vérification de la taille de l'amplicon, par migration des produits de PCR sur gel d'agarose. Ils seront considérés positifs si la taille de l'amplicon est identique à celle de *P. citricarpa*, (69 pb) et négatifs s'il y a absence d'un amplicon à 69 pb.
- a) **Si les deux réplicats de la prise d'essai sont positifs pour le test Gc-F1/-R1/-P1**, la prise d'essai considérée est dite positive pour *P. citricarpa*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *P. citricarpa* détecté dans l'échantillon analysé » en citant la méthode ci-écrite.
- b) **Si un réplikat parmi les deux de la prise d'essai est positif pour le test Gc-F1/-R1/-P1**, refaire un test PCR **Gc-F1/-R1/-P1** en *duplicata*. Si le même résultat est obtenu, des analyses complémentaires devront être entreprises par le Laboratoire National de référence pour vérifier la nature de l'amplicon.



c) **Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test Gc-F1/-R1/-P1 et que la S_{ADN} de la prise d'essai est positive pour le test 18S uni**, l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *P. citricarpa*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *P. citricarpa* non détecté dans l'échantillon analysé » en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode¹.

d) **Si aucun des réplicats de la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test Gc-F1/-R1/-P1 et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni**, la prise d'essai est dite « non utilisable » pour la recherche de *P. citricarpa*. Ce cas de figure traduit i) une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée, ou ii) une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN} . Il faudra donc en premier lieu vérifier qu'une quantité suffisante d'ADN a été extraite pour chacune des prises d'essai par dosage au spectrophotomètre ou par électrophorèse sur gel. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée et une nouvelle prise d'essai sera réalisée si la taille de l'échantillon le permet. Si cela n'est pas possible, le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci-décrite, et il conviendra de mentionner la présence de composés inhibiteur comme cause de l'indétermination.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe 3 résume ces conditions.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « Champignons sur toutes matrices » sous la référence MIAM005.

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none"> L'efficacité de la réaction monoplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de <i>Citrus</i> a été évaluée à 0,97 avec le Mastermix NO ROX (Eurogentec) et à 0,99 avec le Core kit NO ROX (Eurogentec). Le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par le type de pré-mix utilisé. L'efficacité de la réaction sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées préparées dans du tampon TE (1x) et dans de l'ADN d'écorce de <i>Citrus</i>, évaluée respectivement à 0,86 et 1,03, montre que le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la présence d'ADN de <i>Citrus</i> d'un point de vue qualitatif. <p>Le R2 calculé pour les 2 gammes est de 0,99.</p>
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à $4,84 \cdot 10^3$ copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR (soit $2,42 \cdot 10^3$ cp/ μ L) pour une réaction monoplex avec dilution dans du TE (1x).

¹ Le seuil de détection est soit celui de la méthode globale s'il a pu être déterminé, soit celui de la réaction d'amplification par PCR (T_{+LOD}). Dans les deux cas le seuil doit être déterminé expérimentalement par le laboratoire, dans ses propres conditions.



<p>Spécificité analytique</p>	<p>La spécificité analytique du test a été évaluée :</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> avec succès sur une gamme de champignons isolés sur fruits de <i>Citrus</i> (18 espèces, 21 isolats). • <i>in silico</i> et <i>in vitro</i> sur une gamme de différentes espèces appartenant au genre <i>Phyllosticta</i> et présentes sur fruits de <i>Citrus</i> (<i>P. citriasiana</i>, <i>P. citrichinaensis</i>, <i>P. citribraziliensis</i>,). <p>L'évaluation de la spécificité analytique <i>in silico</i> par blast sur GenBank a été démontrée (seules les souches de <i>Phyllosticta citricarpa</i> présentent 100% d'identité).</p> <p>En revanche, l'évaluation de la spécificité analytique <i>in vitro</i> a montré la présence d'une réaction croisée avec <i>Phyllosticta citriasiana</i>, espèce répertoriée uniquement sur <i>Citrus maxima</i> en Asie.</p> <p>Dans les conditions d'analyse de routine (prélèvements de lésions sur fruits symptomatiques), la moyenne des Ct générés par le test, pour de l'ADN d'échantillons naturellement contaminés, est de 23,58 (écart type : 2,31) pour <i>Phyllosticta citricarpa</i> et de 38,21 (écart type : 1,88) pour <i>Phyllosticta citriasiana</i>.</p> <p>Le manque de spécificité de ce test pouvant affecter le résultat d'un point de vue qualitatif (risque de faux positifs), des manipulations complémentaires seront entreprises dans les conditions citées dans la méthode.</p> <p>En conséquence, afin d'éviter tout risque de faux positifs, le témoin en limite pratique de détection (T+Lod) a été caractérisé en fonction des résultats précédents. Celui-ci génère un Ct moyen correspondant à la valeur maximale acceptable (Cut-off) pour déclarer un extrait d'ADN positif. Au-delà de cette valeur, l'extrait d'ADN sera considéré comme positif ou négatif en fonction du résultat obtenu lors des manipulations complémentaires.</p>																																			
<p>Inclusivité</p>	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée <i>in silico</i> par blast sur la base de données GenBank et <i>in vitro</i> sur une gamme d'isolats de <i>P. citricarpa</i> (6 isolats) de provenance géographique différente.</p>																																			
<p>Répétabilité et reproductibilité</p>	<p>Répétabilité</p> <table border="1" data-bbox="400 1420 1291 1720"> <thead> <tr> <th>Cible</th> <th>Concentration de la cible (cp/μL)</th> <th>Résultat qualitatif</th> <th>Moyenne des Ct (±SD)</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>P. citricarpa</i></td> <td>2,42.10^{3*}</td> <td>+</td> <td>30,43±0,27</td> <td>0,88</td> </tr> <tr> <td>Gc-F1/-R1</td> <td>2,42.10^{4*}</td> <td>+</td> <td>26,73±0,09</td> <td>0,34</td> </tr> <tr> <td></td> <td>2,42.10^{5*}</td> <td>+</td> <td>22,89±0,01</td> <td>0,06</td> </tr> <tr> <td></td> <td>2,42.10^{6*}</td> <td>+</td> <td>18,35±0,08</td> <td>0,46</td> </tr> <tr> <td>ADNg de <i>P. citricarpa</i></td> <td>n.d.**</td> <td>+</td> <td>25,06±0,78</td> <td>3,10</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Plasmides dans lesquels sont insérés la région Gc-F1/-R1, dilués dans du Tris Edta (1x). ** Extrait d'ADN d'un échantillon naturellement contaminé</p> <p>La répétabilité qualitative du test est à 100%</p> <p>Reproductibilité</p> <table border="1" data-bbox="400 1906 1291 1966"> <thead> <tr> <th>Cible</th> <th>Concentration de la cible</th> <th>Résultat qualitatif</th> <th>Moyenne des Ct (±SD)</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> </tbody> </table>	Cible	Concentration de la cible (cp/μL)	Résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)	CV (%)	<i>P. citricarpa</i>	2,42.10 ^{3*}	+	30,43±0,27	0,88	Gc-F1/-R1	2,42.10 ^{4*}	+	26,73±0,09	0,34		2,42.10 ^{5*}	+	22,89±0,01	0,06		2,42.10 ^{6*}	+	18,35±0,08	0,46	ADNg de <i>P. citricarpa</i>	n.d.**	+	25,06±0,78	3,10	Cible	Concentration de la cible	Résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)	CV (%)
Cible	Concentration de la cible (cp/μL)	Résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)	CV (%)																																
<i>P. citricarpa</i>	2,42.10 ^{3*}	+	30,43±0,27	0,88																																
Gc-F1/-R1	2,42.10 ^{4*}	+	26,73±0,09	0,34																																
	2,42.10 ^{5*}	+	22,89±0,01	0,06																																
	2,42.10 ^{6*}	+	18,35±0,08	0,46																																
ADNg de <i>P. citricarpa</i>	n.d.**	+	25,06±0,78	3,10																																
Cible	Concentration de la cible	Résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)	CV (%)																																



	(cp/μL)			
<i>P. citricarpa</i>	2,42.10 ^{2*}	+	34,56±1,42	4,13
Gc-F1/-R1	2,42.10 ^{3*}	+	30,34±1,07	3,55
	2,42.10 ^{4*}	+	27,02±1,17	4,36
ADNg de <i>P. citricarpa</i>	n.d.**	+	20,32±0,5	2,93
* Plasmides dans lesquels sont insérés la région Gc-F1/-R1, dilués dans du Tris Edta (1x). ** Extrait d'ADN d'un échantillon naturellement contaminé				
La reproductibilité qualitative du test est à 100%				
Robustesse	Le tableau ci-dessous présente les résultats de robustesse de la sensibilité à une concentration proche de la limite de détection (variation de volume réactionnel et du volume d'ADN matrice)			
	Paramètres	Moyenne Ct (±SD)^{***}		
	Volume réactionnel	18 μL	20 μL	22 μL
		33,15±0,52 ^a	33,43±0,37 ^a	33,42±0,52 ^a
	Volume d'extrait d'ADN testé	1.8 μL	2.0 μL	2.2 μL
		33,5±0,47 ^a	33,76±0,50 ^a	33,50±0,48 ^a
	^a test d'une solution à 2.42.10 ² copies plasmidique/μL ^{**} Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher LSD			
	Le test est robuste en sensibilité pour les paramètres listés dans le tableau ci-dessus.			
	Le tableau ci-dessous présente les résultats de robustesse de la sensibilité et de la spécificité (variation de volume réactionnel, du volume d'ADN matrice, et de la température d'hybridation /polymérisation)			
	Paramètres		Moyenne Ct (±SD)	
		T°C hybridation		
	[cible]*	58°C	60°C	62°C
<i>P. citricarpa</i>	2,42.10 ³ cp/μL	30,18±0,44 ^b	29,59±0,25 ^a	30,19±0,18 ^b
Gc-F1/-R1	2,42.10 ⁴ cp/μL	26,44±0,39 ^b	25,67±0,16 ^a	26,13±0,22 ^b
ADNg de fruit contaminé par <i>P. citricarpa</i>	n.d.**	21,32±0,15 ^c	21,07±0,07 ^b	20,76±0,1 ^a
ADNg de <i>P. citriasiana</i>	0.5 ng/μL***	32,9±0,27 ^a	33,84±0,29 ^b	35,23±0,47 ^c
^a Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Fisher * Plasmides dans lesquels sont insérés la région Gc-F1/-R1, dilués dans du Tris Edta (1x). ^{**} Extrait d'ADN d'un échantillon naturellement contaminé par la cible ^{***} Extrait d'ADN d'un isolat de <i>P. citriasiana</i> à 0.5 ng/μL (espèce très proche phylogénétiquement de la cible)				
La variation de ±2°C de la température d'hybridation induit des variations de sensibilité mais				



	n'a pas d'effet sur le résultat qualitatif (cible toujours détectée (pas de faux négatifs) et présence d'une réaction croisée avec <i>P. citriasiana</i>).
Sensibilité relative	Ces critères n'ont pas été évalués de façon expérimentale par le laboratoire. Différentes méthodes : i) Méthode par incubation de lésions sur fruits et caractérisation microscopique des conidies, ii) Méthode par isolement du parasite à partir de fruits infectés et caractérisation microscopique de la culture obtenue, iii) Méthode par détection moléculaire du parasite directement à partir des fruits infectés par PCR conventionnelle, ont été évaluées et comparées dans la littérature scientifique. De plus, L'expérience du laboratoire, qui a mis en œuvre ces différentes techniques au cours du temps, permet de confirmer le manque de sensibilité et de spécificité des méthodes citées ci-dessus. Des données plus précises sont disponibles dans le dossier LNR de validation de la présente méthode.
Spécificité relative	
Exactitude relative	
Autres critères : Multiplexage	La perte non acceptable de sensibilité analytique par rapport à une utilisation en duplex a démontré que l'utilisation en multiplexage du test n'est pas envisageable.
Autres critères : Durée d'analyse	Durée de la nouvelle méthode : 1 journée



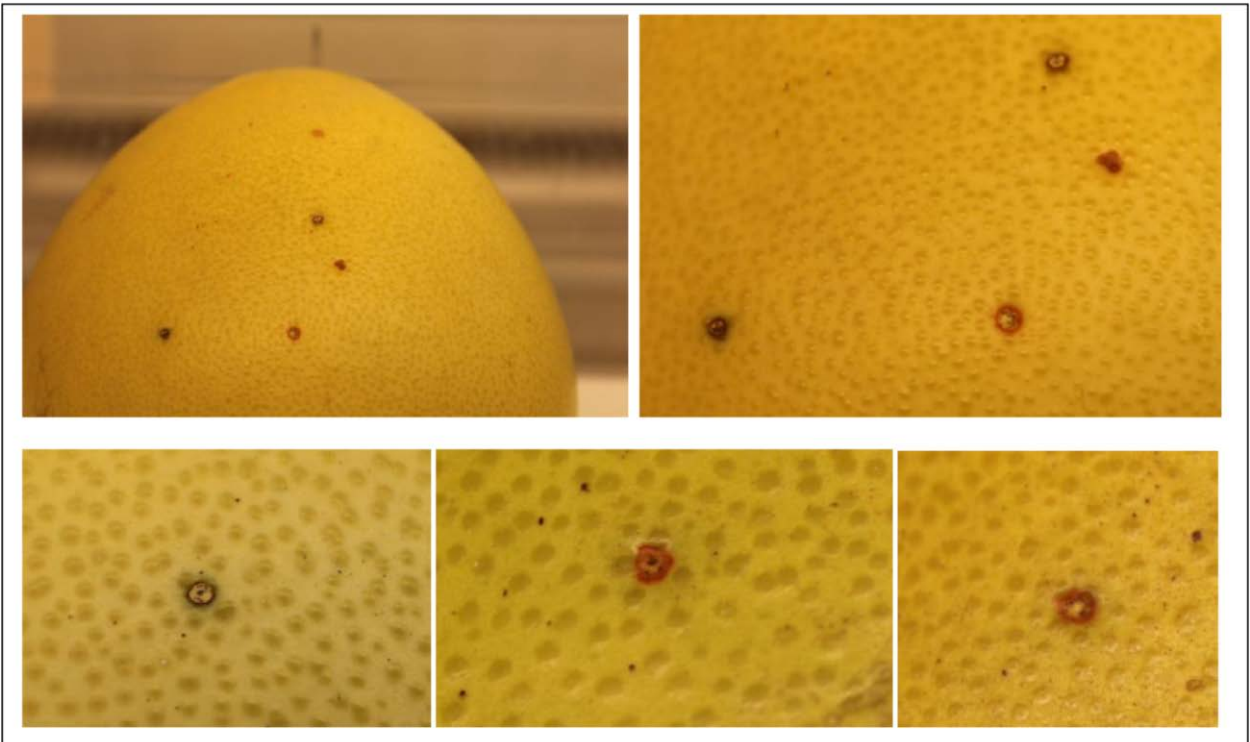
Annexe 1 : Symptômes de *P. citricarpa* sur *Citrus sinensis*

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)





Annexe 2 : Symptômes de *Phyllosticta citriasiana* et de *Colletotrichum* sp.



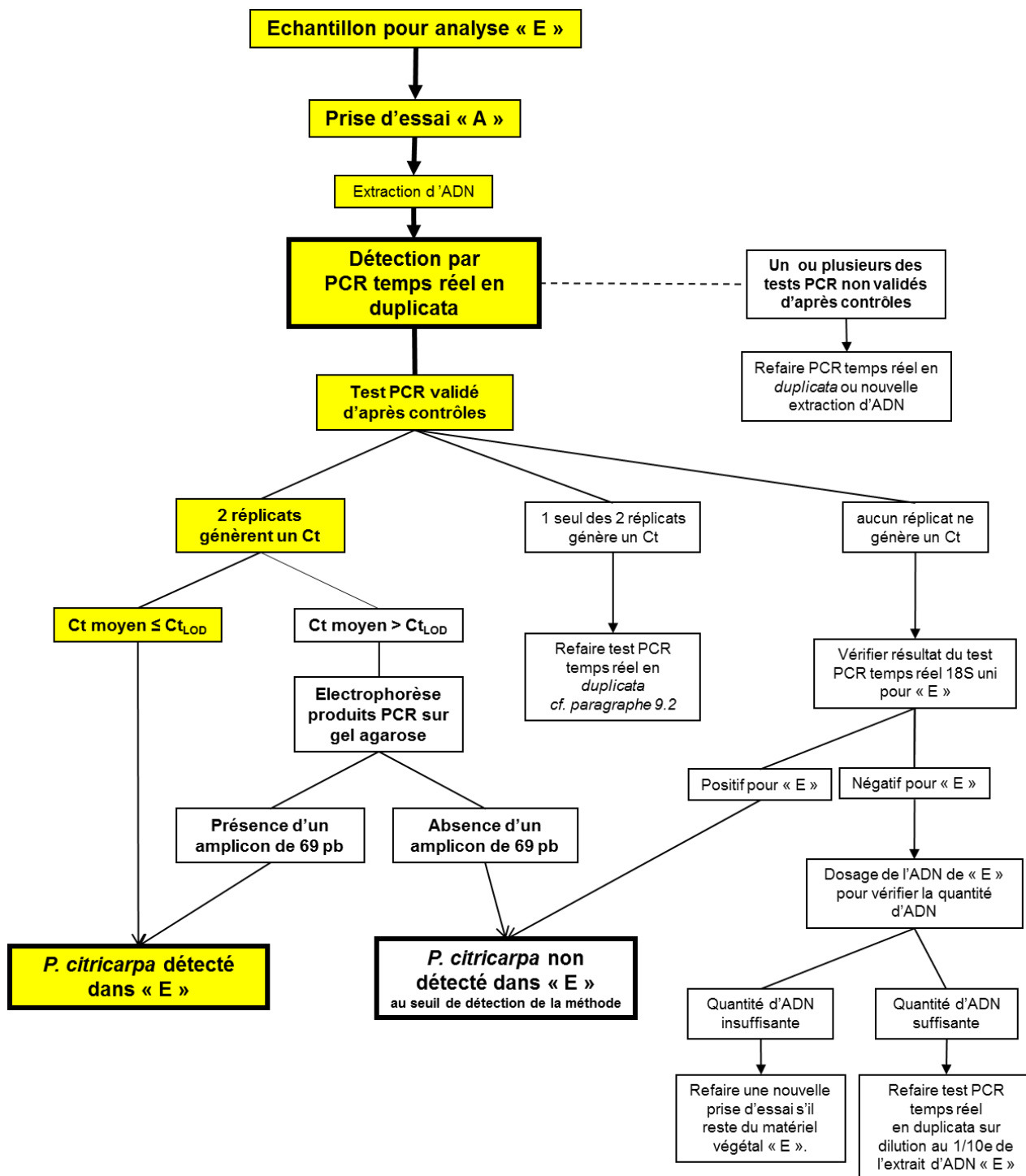
Symptômes de *Phyllosticta citriasiana* sur *Citrus maxima* (photos : ANSES-LSV-Unité de mycologie)



Symptômes de *Colletotrichum* sp. sur *Citrus sinensis* (photos : ANSES-LSV-Unité de mycologie)



Annexe 3 : Schéma décisionnel





Bibliographie

Van Gent Pelzer M.P.E., Van Brouwershaven I.R., Kox L.F.F., Bonants P.J.M., 2007. A TaqMan PCR Method for routine Diagnosis of the Quarantine Fungus *Guignardia citricarpa* on Citrus fruit. *Phytopathology*, 155, 357-363.

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

Kiely, T.B. 1949a. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n.sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp., and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, 73: 249-292.