



**Détection de
Gibberella circinata
sur tissus végétatifs
par PCR en temps réel**

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

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

Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
Version 1 a	Mars 2010	Juin 2011	Mars 2010	Septembre 2014
Version 2 consultation	Mai 2014	Fin juin 2014	x	x
Version 2a	x	x	Septembre 2014	

SOMMAIRE

PREAMBULE	4
Objet des méthodes officielles	4
Glossaire, abréviations et documents connexes	4
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus	4
Échantillonnage et échantillon	4
Modification des méthodes officielles	4
Considérations d'ordre métrologique	5
Obligations réglementaires et limites de responsabilité	5
Revue des méthodes officielles, amendement et modification	6
ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS.....	7
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE.....	8
Modifications	8
Améliorations	8
DESCRIPTION DE LA METHODE	9
1. Objet	9
2. Domaine d'application.	10
3. Présentation schématique de la détection.....	11
4. Produits et consommables	12
5. Appareillage et matériel	13
6. Contrôles et témoins	13
7. Prise d'essai.....	14
8. Etapes de l'analyse	15
8.1. Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total.....	15
8.2. Test de détection par PCR en temps réel.....	15
9. Résultats	16
9.1. Validation de l'analyse.....	16
9.2. Interprétation et formulation des résultats.....	17
10. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	18
11. Conservation des reliquats de matériels utilisés.....	18
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	19
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	20
ANNEXE I	21

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

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.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. 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 des méthodes).

Volume	volume < à 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ à 10 mL : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = ± 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = ± 4°C congélateur : ≤ -18°C congélateur froid intense : ≤ -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Gibberella circinata* (Ioos et al. 2009). Elle a bénéficié de la collaboration de T. Gordon (University of California, Davis)

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV et a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

Suite aux résultats d'études complémentaires réalisées par le LNR, le test de PCR conventionnelle utilisé dans la précédente version de la méthode a été jugé insuffisamment spécifique (dossier de validation LNR concernant les MOA 003 parties A et B). L'utilisation de ce test PCR conventionnel pour confirmation des positifs générés en PCR en temps réel a donc été supprimée dans cette nouvelle version de la méthode. Les échantillons officiels dans lesquels *Gibberella circinata* est détecté seront systématiquement confirmés par le LNR, notamment par l'analyse de séquençage des amplicons générés par PCR en temps réel.

AMELIORATIONS

- Le passage de l'analyse en *triplicata* à l'analyse en *duplicata* des extraits d'ADN permet de se mettre en adéquation avec les exigences de la MOA022.
- Certains passages de la précédente version ont été supprimés ou simplifiés pour rendre la méthode plus lisible.
- La nouvelle version intègre désormais à titre indicatif certaines caractéristiques de performance de la méthode, ainsi que la description de certains réactifs et matériels utilisés dans le cadre de la validation initiale de la méthode par le LNR.

DESCRIPTION DE LA METHODE

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.

1. Objet.

Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell (anamorphe *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.

G. circinata cause des lésions qui peuvent encercler voire étrangler des branches, des racines apparentes, voire des troncs de *Pinus* spp. Chez *P. menziesii*, les symptômes décrits se limitent à des dépérissements d'extrémité de rameaux. L'extrémité des branches étranglées par la nécrose peut flétrir ou dépérir à cause d'une mauvaise circulation des flux de sèves. Les aiguilles sur ces extrémités de branches peuvent jaunir ou rougir, puis finalement tomber. Des faisceaux entiers d'aiguilles peuvent aussi finir par chuter, laissant les branches nues. Des points d'infection multiples à différents endroits de la couronne peuvent finir par causer un dépérissement généralisé à ce niveau, pour aboutir à la mort de l'arbre dans les cas les plus sévères. Des chancres à méplat ou d'aspect humide peuvent apparaître sur le tronc lorsque l'arbre présente de nombreux sites d'infections sur les branches.

Au niveau des branches, voire du tronc, l'arbre produit d'abondants suintements de résine en réponse à l'infection par ce parasite.

Le champignon n'est pas décrit comme parasite vasculaire, chaque chancre ou lésion est donc la conséquence d'une infection distincte. Les insectes foreurs sont les principaux vecteurs du parasite, et vont initier les sites d'infections sur un arbre.

Sur des plantules infectées, l'infection se manifeste généralement par un symptôme de type fonte de semis. Il est toutefois possible que le champignon affecte une plantule sans symptôme apparent pendant plusieurs mois avant d'exprimer la maladie (infection latente).

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *G. circinata* dans des tissus végétatifs de *Pinus* et *Ps. menziesii* par le biais d'un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps-réel.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *G. circinata* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *G. circinata* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

De nombreuses espèces de *Fusarium* phylogénétiquement proches (y compris non formellement décrites) de *F. circinatum* peuvent être présentes dans les mêmes matrices. Afin de sécuriser la spécificité de détection de *G. circinata*, le séquençage du produit positif de PCR par le LNR peut permettre de confirmer avec certitude l'identité de ce dernier.

Cette technique permet de détecter l'organisme cible quel que soit son état physiologique.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode concerne uniquement les semis, plants et sujets adultes de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. La méthode présentée est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'import ou à l'export de végétaux

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des semences de *Pinus* spp et *Pseudotsuga menziesii*. Le protocole de prise d'essai et de broyage de tissu été adaptée pour pouvoir analyser avec le même principe des tissus végétatifs lignifiés.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs présentant des symptômes (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines, etc.) de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*. Elle peut également s'appliquer sur des tissus ne présentant pas de symptôme apparent, en cas de suspicion d'infection latente.

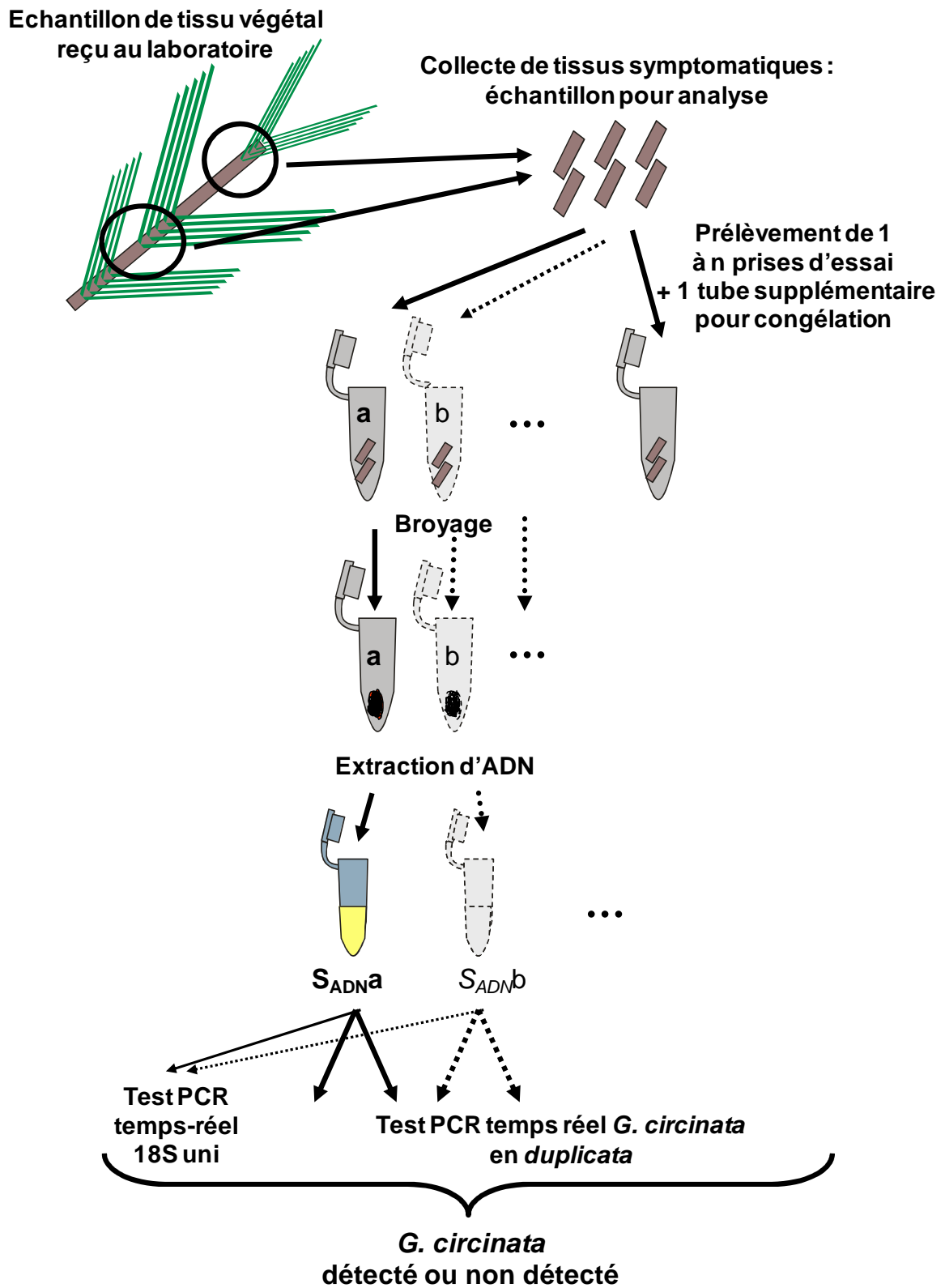
Précaution(s) particulière(s) à prendre.

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 10 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

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

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne.

3. Présentation schématique de la détection



4. Produits et consommables

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.

Les marques de réactifs indiquées dans ce paragraphe ne sont pas prescriptives. Elles correspondent aux réactifs utilisés par le LNR pour la caractérisation et la validation de la présente méthode. D'autres marques peuvent être utilisées à partir du moment où il a été démontré qu'elles permettraient d'obtenir, pour cette méthode, des performances au moins équivalentes à celles qui sont citées.

Eau de qualité Ultra Pure

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

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

Kits d'extraction d'ADN de plante

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit utilisé lors de la caractérisation et validé pour cette méthode est NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) (loos et al., 2009, dossier LNR de validation de la méthode MOA003).

Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>G. circinata</i>	FCIR-F ^a	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC
	FCIR-R ^a	CGATCCTCAAATCGACCAAGA
	FCIR-P ^a	[6-FAM]-CGAGTCTGGCGGGACTTTGTGC-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^a	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^a	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^a	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a (loos et al. 2009)

Les sondes marquées, sous forme concentrée ou diluée sont conservées et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière, ou en les protégeant de cette dernière (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 peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

Kit de PCR en temps-réel

Le kit utilisé lors de la caractérisation et validé pour cette méthode est le qPCR core kit no ROX (Eurogentec) (loos et al., 2009, dossier LNR de validation de la méthode MOA003).

Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés

- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Billes de broyage stériles en acier ou en carbure de tungstène de 3 mm de diamètre.

5. Appareillage et matériel

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 reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été initialement développée et validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research.
- Broyeur de tissu oscillant (de type « beadbeater ») avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 ml
- 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)

6. Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel autorise 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 amplifiable (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 supérieure 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 *G. circinata*. L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) ou le Ct moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (tissus végétatifs de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 16.9 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA003).*
- **Un témoin négatif de processus (T_{PROC}) ou un témoin négatif d'extraction ($T_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= " $T_{extr.}$ "), c'est à dire un microtube de 2 ml stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon de tissus de *Pinus* reconnu non contaminé par *G. circinata* (témoin négatif de processus, T_{PROC}). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
- **Un témoin positif $T_{+18S PINUS}$** 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 $T_{+18S PINUS}$ est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est

clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P à partir d'ADN de *Pinus*, ou d'une solution d'ADN de tissus végétatifs de *Pinus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillon 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 FCIR-F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique, volumétrique, et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de *G. circinata* 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 *G. circinata* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FCIR-F/-P/-R. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la limite de détection du test a été déterminée à 474 copies plasmidiques de cible par tube de PCR (Dossier LNR de validation de la méthode MOA003)*
- **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 FCIR-F/-R/-P. 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 SADN dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la norme XP V03-043 et MOA022.

L'utilisation de ces contrôles et témoins permet de s'affranchir de 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 cas d'utilisation d'un thermocycleur à bloc, l'homogénéité de ce dernier devra être démontrée expérimentalement ou par vérification métrologique. Il est par ailleurs recommandé d'effectuer un minimum de maintenance des appareils utilisés et de garantir la traçabilité des consommables utilisés pour pouvoir réagir en cas de problème ou de non-validation de manipulation.

7. Prise d'essai

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 s'effectuera uniquement sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *G. circinata* ou des symptômes douteux. En cas de suspicion d'infection latente sur jeune plant, la prise d'essai s'effectuera au dessus du niveau du collet, sous la forme d'un tronçon de la tige principale. Dans le cas d'analyse de jeunes semis, ces derniers sont rincés à l'eau courante pendant quelques secondes afin d'éliminer tout résidu de support de culture de l'appareil racinaire, avant de procéder au prélèvement de tissu.

Les prélèvements de tissu s'effectuent dans une atmosphère stérile, en utilisant des outils coupants stérilisés. Prélever préférentiellement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée.

Pour un échantillon donné, réaliser une prise d'essai en ciblant les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.

Les fragments de tissus récupérés sont stérilisés en surface par incubation de 1 à 2 minutes dans une solution titrant environ 1.5 % de chlore actif puis rincés dans de l'eau stérile. Les fragments sont ensuite placés sur du papier filtre stérile et séchés par le flux stérile.

Les fragments de tissus sont ensuite découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée en tronçons les plus petits possible (si possible ≤ 2 à 3 mm d'arête). Ces fragments sont ensuite mélangés puis transférés dans un ou plusieurs microtubes de 2 ml en veillant à ne pas dépasser un volume de fragments d'environ 400 à 500 μ l / microtube (se fier aux graduations du tube).. En règle générale, un seul tube est nécessaire, mais il est possible d'en préparer plusieurs si l'échantillon pour analyse présente des symptômes manifestement distincts. Ces microtubes individuels constitueront les prises d'essai.

A cette étape, il est recommandé de préparer un tube supplémentaire de fragments, 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. Etapes de l'analyse

8.1. Broyage des prises d'essai et extraction d'ADN total

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

1. Prélever deux billes de broyage, ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer deux billes de broyage stériles
2. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
3. Ajouter 10 à 20 mg de PVPP en poudre.
4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz. Pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à précipiter.
7. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'éluion. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.2. Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection FCIR-F/R/P

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

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 20 µl
qPCR core kit no ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 µM
DNA Polymerase	0.025 U/µl
Amorce sens FCIR-F	0.3 µM
Amorce antisens FCIR	0.3 µM
Sonde FCIR-P	0.1 µM

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml,
2. Les différents composants, excepté la Polymérase à ADN, 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 identifiables 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 contrôles s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µl 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 sont ajoutés et testées en *duplicata* : T_{-PROC}, T_{+LOD}, etc.. Pour le T-, on substitue à la S_{ADN} 2 µl d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *G. circinata* sont les suivants (Ioos et al. 2009) :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale / activation de la polymérase Hotstart	95 °C	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	70°C	55 sec puis mesure de la fluorescence	

A 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 sera réalisé en parallèle du test de détection de *G. circinata*. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de *G. circinata*, en substituant simplement les amorces et la sonde FCIR-F/-R/-P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *G. circinata*, mis à part la température d'hybridation/synthèse qui est fixée à 65°C et le nombre de cycles nécessaire fixé à 30.

9. Résultats

9.1. Validation de l'analyse

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 répliquats 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 Ct.

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

- Aucun des réplicats de T_{-PROC} 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.
- 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} .
- 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 *G. circinata*.

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. Interprétation et formulation 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 Ct du contrôle $T_{+LOD} = Ct_{LOD}$. Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à $Ct_{LOD} + 3$ seront considérés comme positifs.

- Si les deux réplicats d'une des prises d'essai sont positifs pour le test FCIR-F/-R/-P, la prise d'essai considérée est dite positive pour *G. circinata*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *Gibberella circinata* détecté dans l'échantillon analysé » en citant la méthode ci-décrite. Le LNR devra obligatoirement confirmer ce résultat d'analyse par des moyens complémentaires sur les mêmes extraits d'ADN, et éventuellement sur les autres reliquats d'analyse.
- Si un des deux réplicats d'une des prises d'essai est positif pour le test FCIR-F/-R/-P, refaire un test PCR FCIR-F/-R/-P en *duplicata*. Si le même résultat est obtenu, des analyses complémentaires devront être entreprises pour vérifier la nature de l'amplicon (séquençage) et s'assurer de l'absence de contamination. Si l'absence de contamination est confirmée, le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *résultat indéterminé* » selon la méthode. Les commentaires pourront mentionner que les reliquats d'échantillons seront analysés par le LNR pour analyses complémentaires.
- Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} des deux prises d'essai (S_{ADNa} et S_{ADNb}) n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que les deux S_{ADN} sont positives pour le test 18S uni, l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *G. circinata*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *G. circinata* non détecté dans l'échantillon analysé » en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode¹.
- Si aucun des deux réplicats des deux S_{ADN} de l'une des prises d'essais n'est positif pour le test FCIR-F/-R/-P et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni, la ou les prises d'essai sont dites « non utilisable(s) » pour la recherche de *G. circinata*. 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} . Dans le premier cas i), il faudra 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. Dans le deuxième cas ii), une dilution au 1/10e de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé, le résultat sera alors exprimé par « *résultat indéterminé* » selon la méthode ci décrite, et mentionner la cause de l'indétermination.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume l'ensemble de ces conditions.

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

10. 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.

11. 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, jusqu'à au moins le 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.

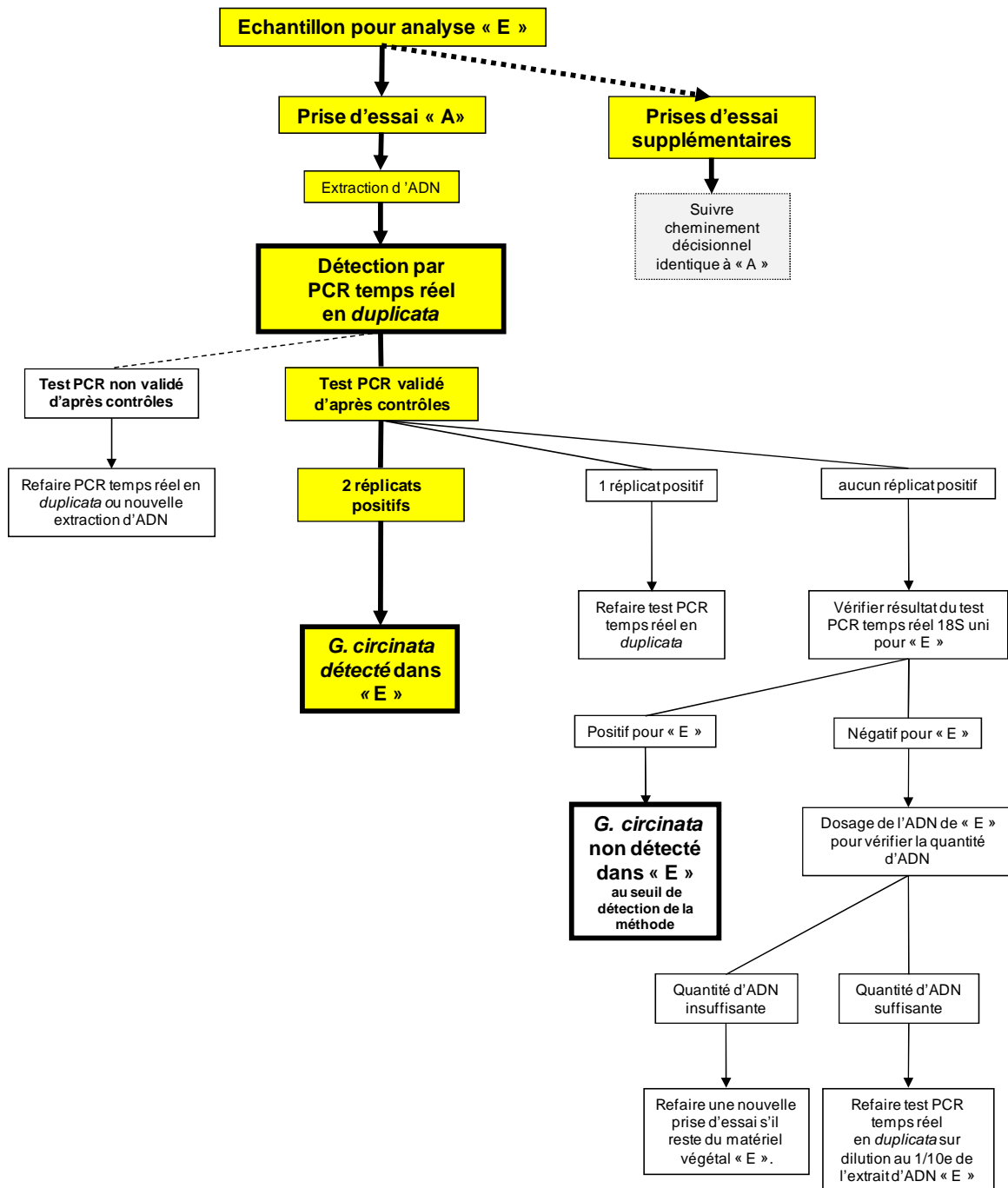
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
Décret 2006-7 du 4 janvier 2006	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
Arrêté ministériel du 19 décembre 2007	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
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

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

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, 582-590.

ANNEXE I



Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire de la santé des végétaux (ANSES),
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lsv@anses.fr**

Ce document est édité par :

**Ministère chargé de l'agriculture
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.

