

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 040- Version 1

Novembre 2015

Détection de *Phytophthora lateralis* par 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		11/2015	Version initiale
v2			
vx			



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, CS 40009, 54220 MALZEVILLE

Contact : Nathalie SCHENCK, nathalie.schenck@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	10
5.1 Eau	10
5.1.1 Xxx.....	Erreur ! Signet non défini.
5.2 Xxx.....	Erreur ! Signet non défini.
5.3 Xxx.....	10
6 Appareillage et matériels	13
7 Échantillons.....	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	Erreur ! Signet non défini.
8 Mode opératoire.....	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Étape 2	Erreur ! Signet non défini.
8.3 Étape 3	Erreur ! Signet non défini.
9 Résultats.....	16
9.1 Contrôle de la validité des résultats	Erreur ! Signet non défini.
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe	Erreur ! Signet non défini.
Bibliographie.....	22



Introduction

Phytophthora lateralis est un oomycète qui est responsable d'importants dégâts sur *Chamaecyparis lawsoniana* (Cyprès de Lawson). Largement répandu sur la côte Ouest des Etats-Unis et du Canada, il est maintenant présent en Europe hors pépinières (Bretagne et Royaume-Uni). Il contamine essentiellement *C. lawsoniana*, d'autres *Chamaecyparis* spp., et sporadiquement d'autres cupressacées. Sa dissémination est souterraine (eau, sol, contacts racinaires) mais également aérienne grâce à la production de sporanges caduques ; il est à l'origine de dépérissements totaux ou partiels liés à des nécroses de la base des végétaux, ainsi que de dessèchements au niveau du feuillage.

Cette méthode qualitative permet de détecter la présence de *Phytophthora lateralis* dans des tissus végétaux végétatifs ; elle utilise la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel. **Elle 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.**



Avvertissements 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 *Phytophthora lateralis* dans des tissus végétatifs symptomatiques. La présence de *P. lateralis* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *P. lateralis* 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 *P. lateralis* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode concerne les semis, plants et sujets adultes de *Chamaecyparis* spp. et autres cupressacées. Néanmoins, selon l'évolution des connaissances scientifiques concernant ce parasite, cette méthode reste utilisable sur d'autres plantes si la gamme d'hôtes potentiels ou avérés venait à s'élargir. Les paramètres de validation de l'analyse seraient toutefois à adapter (Cf. Ct seuil 18S).

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

Cette méthode a été mise au point et validée sur des organes végétatifs de *Chamaecyparis lawsoniana*.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

La méthode s'applique sur tissus végétatifs de toute taille présentant des symptômes (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, rameaux, feuillage, etc.) de végétaux.

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
- [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



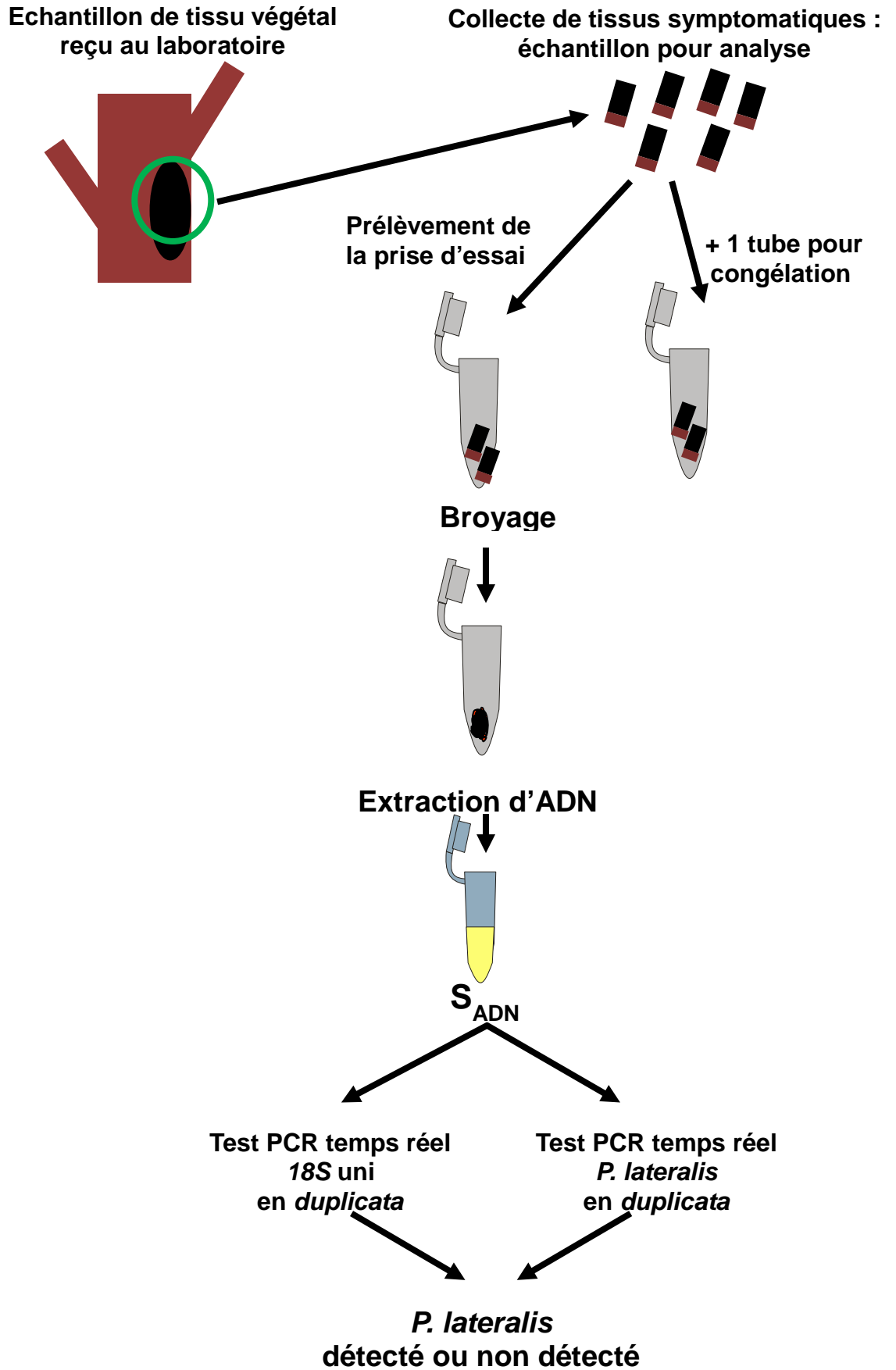
3 Termes, sigles et définitions

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 d'analyse.

4 Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-après :





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 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, 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 initialement validé pour cette méthode est le DNeasy Plant Mini kit (Qiagen), en utilisant le tampon de lyse fourni par le fabricant (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).

5.4 Oligonucléotides

Cible	Amorce sonde	ou Sequence (5'-3')
<i>P. lateralis</i>	qPlat-F ^a	ACGGGATCGTGTTCTAGCAG
	qPlat-R ^a	TAGCTGCACGTCGTTGCTAC
	qPlat-P ^a	[FAM]-TTTTCCCGCTTTCCTTGGGG-[BHQ1]
Plante/oomycète	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a (Schenck *et al.*, 201X), ^b (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 aliquotées 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 de PCR en temps réel : le kit initialement validé pour cette méthode est le qPCR core kit no ROX (Eurogentec) (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).

5.6 Autres consommable à usage unique

- Microtubes de lysing matrix A (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).
- 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.

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 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 supérieur au bruit de fond si de l'ADN de végétal ou de champignon/oomycète 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. lateralis*. 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) 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 *Chamaecyparis lawsoniana* par exemple) 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 18,1** (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).
- **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 pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Le T_{-extr} sera lui aussi traité comme un échantillon pour analyse, suite à quoi une unique prise d'essai de 250 à 500 µl sera réalisée pour extraction d'ADN.

- **Un témoin positif T_{+18S Cham}** 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 Cham} 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 *Chamaecypris lawsoniana*, ou d'une solution d'ADN de *Chamaecypris lawsoniana* 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 qPlat-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 *P. lateralis* 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. lateralis* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR qPlat-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 47,2 copies plasmidiques de cible par tube de PCR (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).
- **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 qPlat-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 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 XP V03-043 et de la méthode MOA022.

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.

Certains des témoins utilisés dans cette méthode sont constitués de cibles d'ADN clonées dans des plasmides bactériens. Ils sont réputés parfaitement stables dans le temps s'ils sont conservés congelés.



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 reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été développée et validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode).
- 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).
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL (cf. Schenck *et al.* (201X) ; dossier LNR de validation de la méthode). 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 seront constitués de tissus végétatifs présentant des symptômes (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, rameaux, feuillage, etc.) de végétaux. Les tissus totalement secs ou morts sont à éviter. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire devra être le plus réduit possible, si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même ils seront conservés au froid avant l'envoi.
- **Confection du colis assurant la conservation, le confinement et une identification claire du contenu :** chaque échantillon devra être enveloppé dans du papier journal ou du papier absorbant avant d'être conditionné dans un emballage hermétique (sac plastique) où sera inscrite à minima la référence figurant sur la fiche de renseignements. Une signalétique de type « quarantaine » figurera sur l'emballage (ex : adhésif « Contrôle phytosanitaire »).
- **Fiche de renseignement comprenant un minimum d'information :** formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche sera fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 15 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.



8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse : 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 sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *P. lateralis* ou éventuellement des symptômes douteux

Cf. annexe 1 : Symptômes de *Phytophthora lateralis*

Les prélèvements de tissu s'effectuent en limite de la zone nécrosée ou colorée 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 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 microtube de lysing matrix A en veillant à ne pas dépasser un volume de fragments d'environ 400 à 500 μ l (se fier aux graduations du tube). **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.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'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. 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).
2. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 1 minute, sur la graduation 6 du Fast Prep. Recommencer cette étape une deuxième fois après une pause d'environ 5 minutes.
3. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre le broyat au fond du tube et réduire la mousse.
4. Incuber chaque tube environ 10 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.



5. 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.
6. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans le volume final recommandé par le fournisseur de kit d'extraction. Cette solution d'ADN total sera ensuite diluée au 1/10^e et cette dilution constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

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

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

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μ l
qPCR core kit no ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 μ M
DNA Polymerase	0.025 U/ μ l
Amorce sens qPlat-F	0.3 μ M
Amorce antisens qPlat-R	0.3 μ M
Sonde qPlat-P	0.1 μ M

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 μ l 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 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 sont ajoutés et testées en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc.. Pour le T_{-} , on substitue à la S_{ADN} 2 μ l d'eau ultra pure stérile. 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 qPlat-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *P. lateralis* sont les suivants (Schenck *et al.*, 201X) :

a)

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	10 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	60°C	45 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 *P. lateralis*. La composition du mélange réactionnel est identique à celle indiquée pour la recherche de *P. lateralis*, en substituant simplement les amorces et la sonde qPlat-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 *P. lateralis*, mis à part le nombre de cycles nécessaire fixé à 30.

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité : 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 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 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_{-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.



- 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. lateralis*.

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 $T_{+LOD} = C_{tLOD}$. Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le C_t moyen est inférieur à $C_{tLOD} + 3$ seront considérés comme positifs.

- a) Si les deux réplicats de la prise d'essai sont positifs pour le test qPlat-F/-R/-P, la prise d'essai considérée est dite positive pour *P. lateralis*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « ***P. lateralis* détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-écrite.
- b) Si un réplicat parmi les deux de la prise d'essai est positif pour le test qPlat-F/-R/-P, refaire un test PCR qPlat-F/-R/-P 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 (par exemple séquençage).
- c) Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test qPlat-F/-R/-P 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. lateralis*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « ***P. lateralis* 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 Plat-F/-R/-P 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. lateralis*. 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) le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionner la présence de composés inhibiteur comme cause de l'indétermination.

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



Le diagramme décisionnel présenté en annexe 2 résume ces conditions.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MIAM003.

Caractéristique de performance	Résultats obtenus																	
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	L'efficacité de réaction a été évaluée à 0,99 quand la gamme est préparée dans de l'eau ultrapure et à 0,86 quand elle est préparée dans de l'ADN de <i>Chamaecypris</i> . Le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la présence d'ADN de <i>Chamaecypris</i> d'un point de vue qualitatif lorsque l'on teste des solutions plasmidiques calibrées, et la limite de détection reste la même. Le R2 calculé pour la gamme diluée dans de l'eau ultrapure est de 0,996.																	
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 47.2 copies plasmidiques (c.p.) par tube de PCR, quel que soit le diluant (eau ultrapure ou solution d'ADN de <i>Chamaecypris</i>).																	
Inclusivité	L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée <i>in silico</i> par BLAST des amorces et de la sonde sur la base de données GenBank, et <i>in vitro</i> sur une gamme représentative de 55 souches de <i>P. lateralis</i> .																	
Spécificité analytique	<p>Les amorces et sondes suivantes ont été optimisées pour leur spécificité <i>in silico</i> et leurs caractéristiques thermodynamiques :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cible</th> <th>Amorce ou sonde</th> <th>Sequence (5'-3')</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3"><i>P. lateralis</i></td> <td>qPlat-F^a</td> <td>ACGGGATCGTGTCTAGCAG</td> </tr> <tr> <td>qPlat-R^a</td> <td>TAGCTGCACGTCGTTGCTAC</td> </tr> <tr> <td>qPlat-P^a</td> <td>[FAM]-TTTTCCCCTTTTCTGGGG-[BHQ1]</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Plante/oomycète</td> <td>18S uni-F^b</td> <td>GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA</td> </tr> <tr> <td>18S uni-R^b</td> <td>CCACCACCCATAGAATCAAGA</td> </tr> <tr> <td>18S uni-P^b</td> <td>[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]</td> </tr> </tbody> </table> <p>^a(Schenck <i>et al.</i>, 201X), ^b (Ioos <i>et al.</i>, 2009)</p> <p>La spécificité analytique a été démontrée avec succès <i>in silico</i> par BLAST et <i>in vitro</i> sur 18 espèces d'oomycètes proches de <i>P. lateralis</i>, 17 espèces de champignons isolés de <i>chamaecypris</i>, et sur une solution d'ADN génomique fortement concentrée de <i>P. ramorum</i> (espèce génétiquement proche de <i>P. lateralis</i>).</p>	Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')	<i>P. lateralis</i>	qPlat-F ^a	ACGGGATCGTGTCTAGCAG	qPlat-R ^a	TAGCTGCACGTCGTTGCTAC	qPlat-P ^a	[FAM]-TTTTCCCCTTTTCTGGGG-[BHQ1]	Plante/oomycète	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]
Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')																
<i>P. lateralis</i>	qPlat-F ^a	ACGGGATCGTGTCTAGCAG																
	qPlat-R ^a	TAGCTGCACGTCGTTGCTAC																
	qPlat-P ^a	[FAM]-TTTTCCCCTTTTCTGGGG-[BHQ1]																
Plante/oomycète	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA																
	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA																
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]																
Répétabilité	Le calcul des coefficients de variation des valeurs de Ct obtenues par 10 répétitions dans le même « run » de PCR, à partir de différents extraits d'ADN (dilutions d'ADN cible proches de la limite de détection, échantillon naturellement contaminé) a																	



	démontré une très bonne répétabilité de la méthode : les valeurs sont toutes comprises entre 0,58% et 1,06%, soit largement en dessous de la limite fixée à 10%.
Reproductibilité	Le calcul des coefficients de variations des valeurs de CT obtenues sur 10 répétitions dans 10 « runs » différents de PCR, effectuées sur différents extraits d'ADN (dilutions d'ADN cible proches de la limite de détection, échantillon naturellement contaminé), a démontré une très bonne reproductibilité de la méthode : les valeurs sont toutes comprises entre 1,78% et 2,51%, soit largement en dessous de la limite fixée à 10%.
Robustesse	Les tests effectués en faisant varier certains paramètres expérimentaux (volume réactionnel $\pm 10\%$, volume d'extrait d'ADN $\pm 10\%$ et température d'hybridation/polymérisation ± 2 ou 3°C), sur différents extraits d'ADN (cible en concentration proche de la limite de détection, échantillon naturellement contaminé, ADN de <i>P. ramorum</i> (espèce proche) en forte concentration) ont tous donné des résultats qualitatifs conformes à ceux attendus : pas de perte de spécificité, effets très limités sur les valeurs moyennes de CT pour les positifs.
Sensibilité, spécificité et exactitude relatives	La comparaison de la méthode PCR en temps réel avec deux autres méthodes : isolement mycologique et PCR conventionnelle (Schena <i>et al.</i> , 2008), effectuée sur 32 échantillons de <i>Chamaecyparis</i> naturellement contaminés ou non par <i>P. lateralis</i> , a montré que cette nouvelle méthode donne statistiquement des résultats au moins aussi bons que les anciennes. Les données sont disponibles dans le dossier LNR de validation de la méthode MIAM003.
Spécificité expérimentale	Le séquençage des produits d'amplification générés à partir de 4 échantillons naturellement contaminés et la comparaison avec des séquences orthologues de <i>P. lateralis</i> sur GenBank ont montré 100% d'identité avec ces séquences orthologues ; aucune amplification non spécifique n'a donc été constatée.
Autres critères : durée d'analyse	Durée estimée de la méthode par PCR en temps réel : 1 journée.



Annexe 1 : Symptômes de *P. lateralis*

Photo 1 : colorations du bois sur base de tronc de *Chamaecyparis lawsoniana*



Photo 2 : nécrose sur branche de *C. lawsoniana*



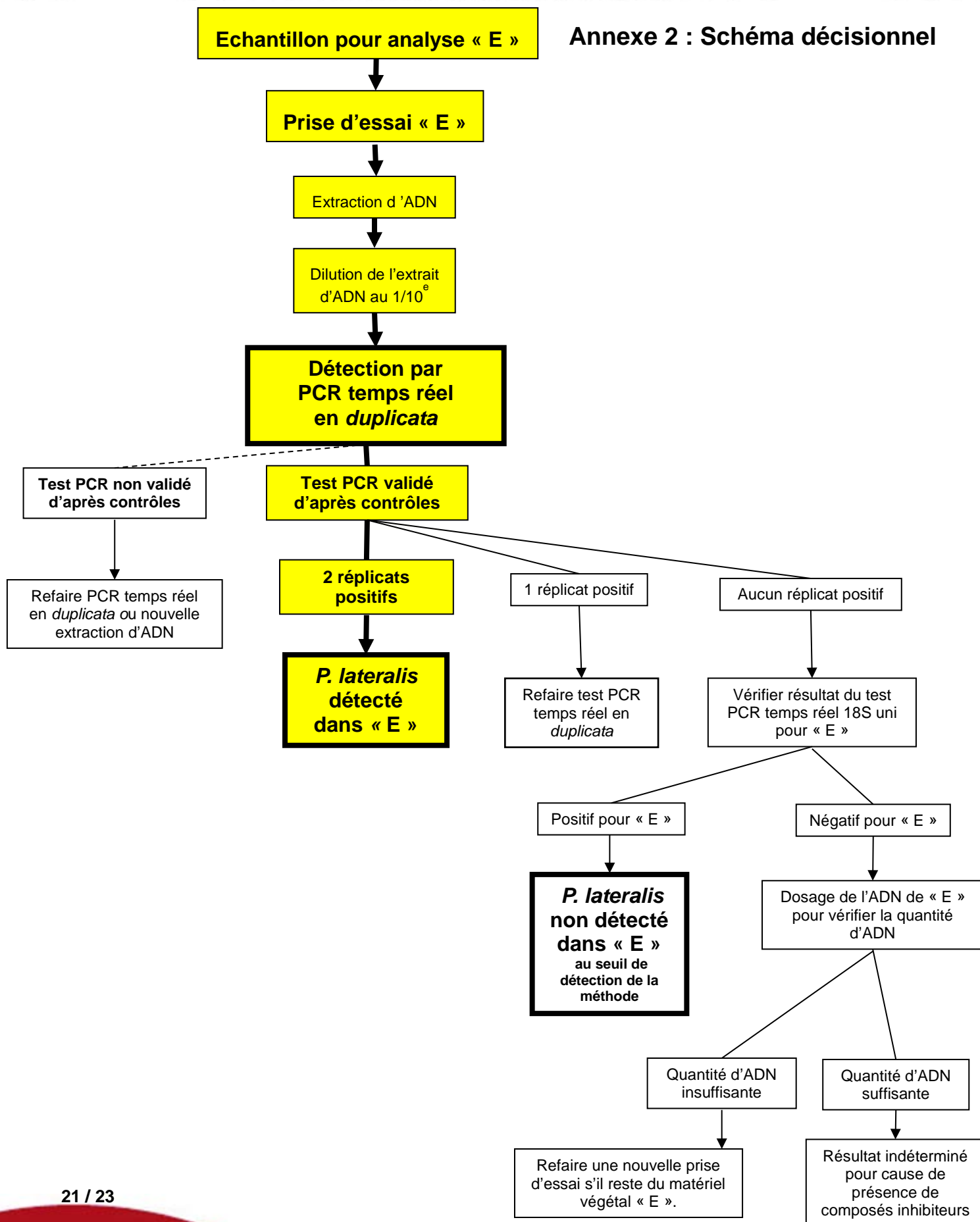
Photo 3 : dessèchements sur feuillage de *C. lawsoniana*



Photo 4 : coloration sur feuillage de *C. lawsoniana*



Annexe 2 : Schéma décisionnel





Bibliographie

loos 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.

Schena L, Duncan JM & Cooke DEL (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of Phytophthora species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* **57**, 64-75.

Schenck N, Fourrier C & loos R (201X) A robust and specific real-time PCR tool for the detection of Phytophthora lateralis in plant tissues. *European Journal of Plant Pathology* **Submitted**.

