



**Détection des phytoplasmes du
groupe 16SrV (Flavescence dorée)
et du groupe 16SrXII (Bois noir) de
la vigne -**

PCR triplex en temps réel



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 18 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.

MOA 006 Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
VV/98/02 version a	Sans objet		1998	2001
VV/98/02 version b	Sans objet		2001	Mars 2004
VV/04/10 version a	Sans objet		Mars 2004	Juin 2010
MOA 006 Partie B version 1a	Avril 2010	Juin 2010	Avril 2010	Décembre 2010
MOA 006 Partie B version 1b	Sans objet	Sans objet	Août 2010	décembre 2015 ¹
MOA 006 version 2 consultation	Août 2014	Septembre 2014	X	X
MOA 006 version 2a	x	x	Juillet 2015	

¹ Les modifications apportées par rapport à la version 1b étant importantes pour le client dans un cadre d'analyses officielles, le délai de 18 mois pour la mise en conformité à la présente version est ramené à 5 mois

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 responsabilités	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	9
3. Présentation schématique de la détection	10
4. Produits et consommables	11
5. Appareillage et matériel.....	12
6. Témoins.....	12
7. Etapes de l'analyse	13
7.1. Prise d'essai.....	13
7.2. Extraction de L'ADN	14
7.3. PCR triplex en temps réel – Amplification des ADN.....	14
8. Résultats.....	16
8.1. Validation de l'analyse	16
8.2. Interprétation des résultats	16
8.3. Formulation des résultats	17
9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	18
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	19
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	20

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 (*antisera*, amorces de PCR...).

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.

Toute 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 ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes) :

Volume	volume < à 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ à 10 mL : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3
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 RESPONSABILITES

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'agriculture, de l'alimentation 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

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs 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 constatée.

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS.

Le laboratoire national de la protection des végétaux Station d'Angers remercie les anciens collègues du LNPV de Colmar qui avaient rédigé la méthode VV/04/10 version a de détection des phytoplasmes de la vigne et qui nous ont transmis les éléments de connaissance de la méthode.

Le LNPV Station d'Angers remercie le LDA 71 et l'UMR 1090 « Génomique, Diversité, Pouvoir pathogène » de l'INRA de Bordeaux pour le développement de la technique de PCR triplex en temps réel et leur soutien lors de l'évaluation de cette même technique.

Le LSV Unité BVO remercie les différents relecteurs de la présente version et des suggestions qu'ils ont formulées pour l'amélioration de cette dernière.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le LSV Unité Bactériologie, virologie et OGM d'Angers ainsi que l'unité « Coordination de la référence ».

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: le 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

Les modifications apportées par la présente version par rapport à la version 1b sont les suivantes :

- La méthode de détection des phytoplasmes de la vigne par PCR multiplex gigogne a été supprimée pour défauts de reproductibilité ;
- Le domaine d'application de la méthode a été restreint aux pétioles et aux nervures primaires. Le LNR peut toutefois analyser des types de matériel différents (ex. : autres parties du cep de vigne, vecteurs).
- Les seuils « absolus » d'acceptabilité de la qualité des extraits ADN et de positivité ont été supprimés de la présente version. Les modalités de détermination de ces derniers par les laboratoires utilisateurs de la méthode sont précisées.
- Une seule modalité d'amplification des extraits ADN a été retenue : le nombre de puits à déposer est fixé à 1 lors de la première analyse
- Les règles d'interprétation et de formulation des résultats d'amplification des extraits ADN ont été revues pour les préciser et répondre aux besoins du gestionnaire de risques.

Ces modifications de fond sont apportées sur la base de nouvelles données scientifiques sur la méthode et en réponse à un besoin du client dans un cadre d'analyses officielles en ce qui concerne la formulation des résultats.

La mise en œuvre de la présente version ne nécessite néanmoins aucune nouvelle compétence technique et ne fait appel à aucun nouveau principe de mesure. Les laboratoires utilisateurs devront en revanche déterminer au sein de leur laboratoire les valeurs de Ct de leur témoin en limite de répétabilité et en assurer la traçabilité.

AMELIORATIONS

Quelques modifications de forme ont également été apportées pour une meilleure lisibilité.

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 *a minima* qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

1. Objet

La Flavescence dorée (FD) et le Bois noir (BN) sont deux des plus importantes maladies appartenant à la catégorie des jaunisses de la vigne en Europe. Ces deux maladies ne peuvent pas être différenciées d'après leurs symptômes, pourtant elles sont associées à deux phytoplasmes différents appartenant respectivement au groupe de la Jaunisse de l'orme (16 SrV) et au groupe du Stolbur (16 SrXII) (Lee *et al.*, 1998).

La présente méthode permet, sur vigne, de détecter spécifiquement et simultanément, les phytoplasmes du groupe 16SrV (Flavescence dorée - FD), organisme nuisible de quarantaine (arrêté de lutte obligatoire en vigueur) et ceux du groupe 16SrXII (Bois noir - BN).

Différentes méthodes pour extraire l'ADN total de la vigne ont été éprouvées. L'utilisation d'un détergent puissant, le CTAB (Cetyl triméthylammonium bromide), est celle qui est retenue (point 7.2). La technique décrite ensuite permet l'amplification simultanée de deux fragments d'ADN spécifiques pour l'un des phytoplasmes du groupe 16SrV (FD) et des phytoplasmes du groupe 16SrXII (BN) pour l'autre avec également un contrôle positif interne « vigne ».

2. Domaine d'application

- **Objets susceptibles d'être soumis à analyse.**

La méthode s'applique aux feuilles de vigne (pétiole et nervures primaires). L'analyse sur d'autres parties du cep de vigne ou sur vecteur est possible dans certains cas particuliers. Dans ce cas, le client est invité à prendre contact directement avec le LNR.

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

Il est préférable de soumettre à l'essai des feuilles de vigne, récoltées à partir du stade début de véraison jusqu'avant la sénescence (fin août à fin-octobre), présentant des symptômes typiques de jaunisses de la vigne.

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire en bon état, propre, frais et non nécrosé. Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

- **Grandeur de l'objet soumis à analyse.**

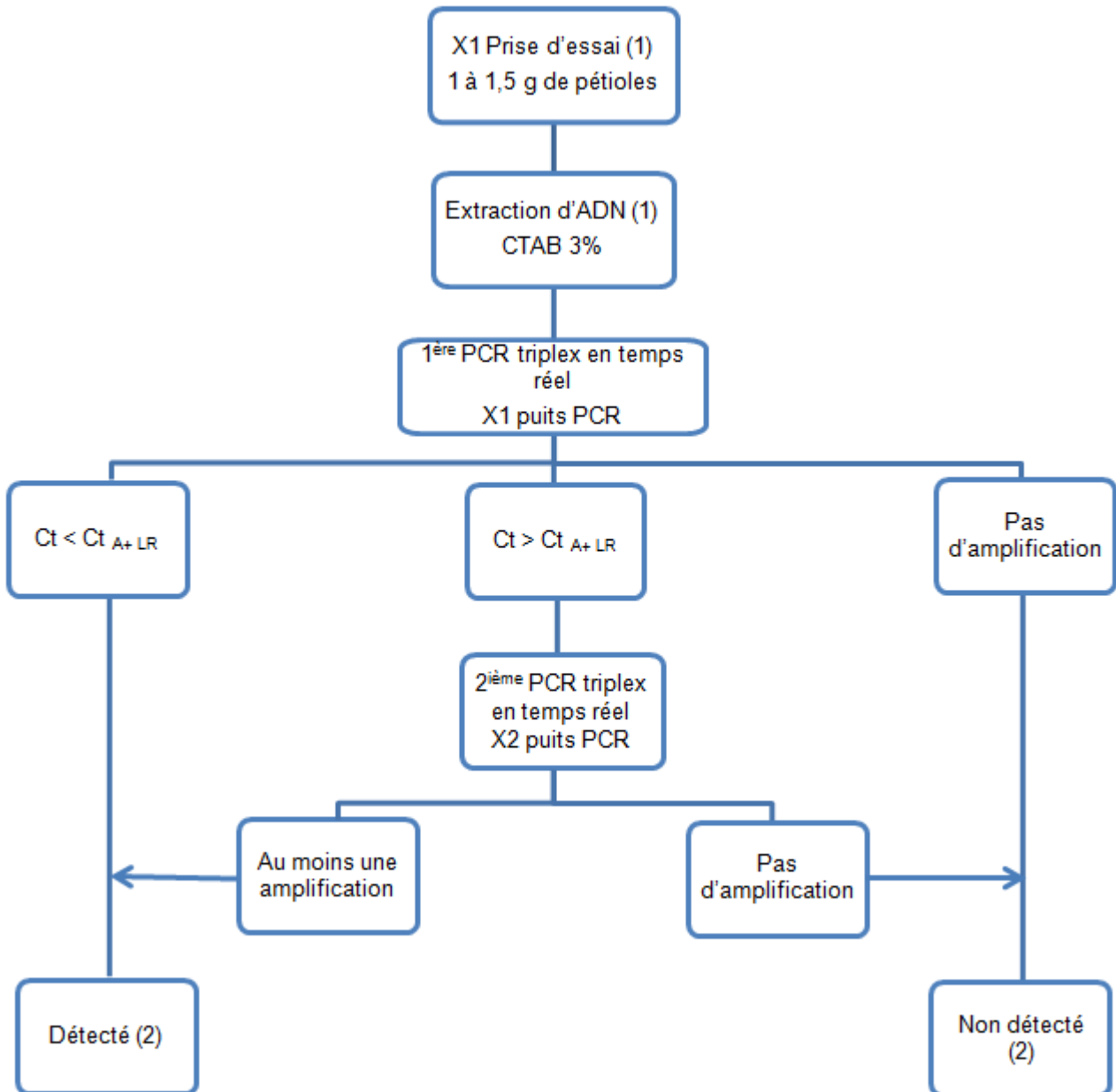
L'analyse se réalise sur 1 à 1,5 g de matériel végétal (pétiole ou nervures primaires) prélevées à partir de l'échantillon pour analyse. En deçà de cette quantité de matériel végétal, une réserve est émise sur tout résultat d'analyse négatif en précisant que la quantité de matériel végétal est inférieure à celle requise par la présente méthode.

- **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 5 jours pour les feuilles prélevées dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être

conservé au réfrigérateur. Si les feuilles ne peuvent être analysées immédiatement, les pétioles doivent être prélevés et congelés dans le sachet de broyage en attente de traitement (point 7.1).

3. Présentation schématique de la détection



(1) conserver au congélateur le restant de matériel végétal et/ou d'ADN. Sur demande de l'expéditeur, l'analyse peut être reprise soit à partir du reliquat de matériel végétal soit à partir de l'extrait végétal.

(2) Un commentaire sera émis sur les rapports d'analyse lorsque le résultat sera lié à une 2nd amplification de l'extrait ADN (voir point 8.3)

A+ LR : Témoin positif de PCR en limite de répétabilité

4. Produits et consommables

Voir les recommandations générales définies dans la MOA 022.

• Tampons

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

- tampon de broyage CTAB 3% ;
- β-mercapto éthanol ;
- chloroforme/alcool isoamylique (24/1);
- isopropanol;
- éthanol à 70%;

La composition des tampons est donnée dans le REP-001 : « Répertoire des recettes » en vigueur au LSV.

• Oligonucléotides

Les amorces et les sondes doivent être purifiées par HPLC.

Cibles	Amorces et Sondes	Séquences
Phytoplasmes du groupe 16SrV – (Flavescence dorée)	<i>mapFD-F</i> <i>mapFD-R</i> <i>mapFD-FAM</i>	5'-TCA AGG CTT CGG BGG TTA TA-3' 5'-TTG TTT TAG AAG GTA ATC CGT GAA CTA C-3' FAM- TTG TAT TTC AGT GAA TGA AG –MGB ¹
Phytoplasmes du groupe 16SrXII – (Bois noir)	<i>mapBN-F</i> <i>mapBN-R</i> <i>mapBN-VIC</i>	5'-ATT TGA TGA AAC ACG CTG GAT TAA-3' 5'-TCC CTG GAA CAA TAA AAG TYG CA-3 VIC- AAA CCC ACA AAA TGC –MGB ¹
Vigne	<i>VITIS-F</i> <i>VITIS-R</i> <i>VITIS-Cy5</i> ²	5'-AAA TTC AGG GAA ACC CTG GAA-3' 5'-CCC TTG GTT GTT TTC GGA AA-3' Cy5- CtG agC cAA atc C –BHQ-2 ^{3; 4}

¹ : MGB = Minor groove binder

² : une autre sonde peut-être utilisée ; pour information, Pelletier *et al.*, 2009 ou s'adresser au LNR.

³ : **a**, **t**, **g**, **c** = base LNA (Locked nucleic acid[®])

⁴ : BHQ-2 = Black hole quencher[®]

• Kit de PCR

La présente méthode a été caractérisée et validée avec le kit QuantiTect[®] Multiplex PCR No Rox de la société Qiagen (ou le même kit contenant du Rox en référence passive pour les thermocycleurs qui le nécessitent).

D'autres pré-mix ou kit commerciaux de PCR peuvent toutefois être utilisés, pourvu qu'ils aient démontré d'égales performances de sensibilité et de spécificité lors d'essais préliminaires effectués sur des extraits d'ADN totaux de vigne contaminée par les phytoplasmes cibles, dans les conditions d'utilisation décrites par la présente méthode.

• Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés,
- Microtubes stériles de 1,5 et de 2 mL,
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96,
- Sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon.

Parmi les consommables spécifiques, il convient d'utiliser des consommables exempts de RNase et DNase et des cônes de prélèvement avec filtre.

Les plastiques utilisés lors de l'amplification doivent être recommandés pour une utilisation en PCR en temps réel (plastique non fluorescent, bouchons optiquement clairs). Les gants sont non poudrés.

5. Appareillage et matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire décrit dans la MOA 022, pour certaines phases de l'analyse, le matériel suivant est jugé nécessaire :

- **Prise d'analyse**

- Balance de type II.
- Tout outil éventuellement nécessaire pour prélever l'échantillon de laboratoire et effectuer une fragmentation sommaire des tissus végétaux : sécateur; ciseaux, emporte pièce... ;
- Broyeur de tissus végétaux et petit matériel adapté pour dilacérer les tissus végétaux, par exemple : broyeur à billes avec sachets de broyage, broyeur à rouleaux avec tubes (type hémolyse), presse à genouillère, ou ensemble équivalent permettant le broyage en présence de tampon ;

- **Extraction de l'ADN**

- Sorbonne ou hotte chimique permettant la manipulation des produits volatils nocifs ou pulvérulents ;
- Verrerie pour les préparations et le stockage (flacons bouchonnés et éprouvettes) pouvant être autoclavée ;
- pH-mètre ;
- Eau de qualité biologie moléculaire ultrapure (équipement pour production d'eau ou achat de l'eau au titre des consommables) ;
- Centrifugeuse pour clarification des extraits végétaux (environ 1 000 g) ;
- Bain marie ou étuve permettant le maintien des extraits à une température de environ 65 °C pour favoriser l'action du CTAB ;
- Centrifugeuses permettant la purification puis la précipitation de l'ADN (environ 10 000 g) ;
- Concentrateur (centrifugation sous vide partiel) ou matériel équivalent (bain à sec, étuve, ...) facilitant l'évaporation et le séchage (équipement recommandé).

- **Amplification de l'ADN**

Le thermocycleur doit posséder un système d'excitation des fluorophores et de lecture de la fluorescence émise – Thermocycleur pour PCR en temps réel.

6. Témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR inclut l'utilisation d'une série de témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

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

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

- **Témoin négatif d'extraction (en général « E- »)**

Echantillon de vigne reconnu « non contaminé » par les phytoplasmes des groupes 16SrV et 16SrXII soumis à toutes les étapes dès l'extraction. Ce contrôle permet de vérifier qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la phase d'extraction/purification d'ADN dans une série d'analyses (1 puits au minimum).

- **Témoin positif d'extraction (en général « E+ »)**

Echantillon de vigne reconnu « contaminé » par au moins un phytoplasme du groupe 16SrV ou 16SrXII et soumis à toutes les étapes dès l'extraction (1 puits au minimum).

NOTE : Les témoins d'extraction sont traités de la même manière que les échantillons d'essai.

- **Témoin négatif de PCR (en général « A - »)**

Réaction de PCR réalisée avec de l'eau et/ou mélange réactionnel exempt d'ADN et d'inhibiteur de PCR (1 puits au minimum).

- **Témoin positif de PCR (en général « A + »)**

Réaction de PCR contenant les séquences d'ADN cible (« FD », « BN » et « vigne ») en quantité ou en nombre de copies détectable. Les témoins positifs d'extraction des manipulations précédentes peuvent faire office de A+ (1 puits au minimum).

- **Témoin positif de PCR en limite de répétabilité (Dilution d'ADN reconnu positif pour la cible « FD » - en général « A+ LR »)**

Il peut être réalisé à l'aide d'une gamme de dilution dans de l'ADN de vigne saine et correspond à la dilution la plus importante d'ADN reconnu positif pour laquelle 6 puits PCR sur 6 donnent un résultat positif pour la détection des phytoplasmes du groupe 16SrV (FD). Ce témoin doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions.

Il permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon optimale en assurant que la plus petite quantité d'acides nucléiques cible est détectable de façon répétable par la méthode dans les conditions de l'essai (1 puits au minimum).

7. Etapes de l'analyse

Les nombreuses étapes nécessaires à l'aboutissement de l'analyse requièrent de fréquents transvasements du matériel traité. Il est impératif que le laboratoire soit particulièrement vigilant et rigoureux pour garantir une bonne traçabilité des produits.

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

7.1. Prise d'essai

Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés.

L'analyse se réalise sur 1 à 1,5 g de matériel végétal à partir de l'échantillon pour analyse. 1 seule prise d'essai est constituée pour chaque échantillon transmis pour analyse au laboratoire.

Pour chacun des échantillons, sélectionner des feuilles avec pétiole, présentant, si possible, des symptômes de type « jaunisse ».

Séparer les pétioles des feuilles et peser 1 à 1,5 g de pétiole. Si la quantité de pétiole est insuffisante, les nervures primaires (feuille sommairement débarrassée du limbe) peuvent être prélevées.

Remarque : Décontaminer (ex. : DNA away, eau de javel...) la partie de l'outil en contact avec le végétal entre chaque prise d'analyse ou utiliser du matériel jetable.

Ainsi préparé, le matériel végétal traité en frais peut être conservé 24 à 48h au réfrigérateur ou de l'ordre de 10 à 12 mois au congélateur.

Il est recommandé de conserver un reliquat de l'échantillon pour pouvoir effectuer le cas échéant une nouvelle analyse (cf. point 3.).

7.2. Extraction de l'ADN

- **Broyage**

Broyer les tissus végétaux constituant la prise d'analyse en présence du tampon de broyage (CTAB 3%). Le ratio poids de tissu végétal / volume de tampon est d'environ 1 g de tissu végétal dans 10 mL de tampon (soit un ratio de 1/10).

Les tissus végétaux doivent être fragmentés finement et de manière homogène.

- **Clarification**

Clarifier l'extrait par centrifugation, à titre indicatif : 1 000 g pendant 10 min.

Conserver le surnageant restant après utilisation. La conservation de l'extrait est possible pour une durée d'environ 1 jour au réfrigérateur.

- **Dénaturation des membranes et libération de l'ADN des phytoplasmes**

Sous la sorbonne, déposer 1 mL de surnageant dans un tube de 2 mL et y ajouter 2 µL de β-mercapto éthanol (concentration finale environ 0,2 %).

Agiter vigoureusement quelques secondes et incuber la suspension pendant 20 min à environ 65°C afin de permettre la dénaturation des membranes par le CTAB.

- **Purification**

Après incubation, ajouter sous la sorbonne, volume pour volume, une solution de chloroforme/alcool iso-amylque (ratio 24/1).

Agiter vigoureusement pendant environ 5 min pour provoquer une émulsion (chloroforme insoluble) puis centrifuger environ 10 min à 10 000 g pour faire précipiter les protéines (température ambiante).

- **Précipitation**

Après purification, transférer environ 750 µL de la phase aqueuse supérieure (ne pas prélever l'interface) dans un tube de 1,5 mL (valeur indicative).

Ajouter le même volume d'isopropanol glacé (conservé au congélateur).

Agiter lentement par retournements environ 5 min afin de précipiter l'ADN, puis centrifuger environ 15 min à 10 000 g pour précipiter l'ADN (contrôle visuel possible).

- **Rinçage de l'ADN**

Éliminer délicatement le surnageant, attention à ne pas perdre le culot d'ADN (parfois un contrôle visuel est possible).

Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70%, agiter par retournement (ADN insoluble) quelques minutes puis centrifuger environ 10 min à 10 000 g.

Éliminer délicatement l'alcool puis sécher le culot. L'élimination de l'alcool et le séchage de l'ADN peuvent être facilités par l'utilisation d'appareil du type concentrateur (évaporation sous vide partiel avec centrifugation pour "regrouper" l'ADN).

- **Conditionnement des extraits**

Le culot d'ADN est dissout dans environ 400 µL d'eau. L'ADN est prêt à être amplifié.

Les suspensions d'ADN peuvent être conservées de l'ordre de 6 à 8 jours au réfrigérateur ou 10 à 12 mois au congélateur.

7.3. PCR triplex en temps réel – Amplification des ADN

L'amplification nécessite 3 couples d'amorces, les 2 premiers étant spécifiques de chacun des groupes de phytoplasmes recherchés, le 3^{ème} permettant l'amplification d'une partie du génome de la vigne. Ce dernier correspond à un contrôle positif interne endogène vigne et il permet la validation du bon état de l'échantillon, de l'étape d'extraction et de la PCR (voir points 4 et 8.1.). A chacun de ces couples est associée une sonde permettant la mise en évidence au cours de l'amplification d'un éventuel produit de PCR.

Pour chaque extrait d'ADN, 1 réaction PCR doit être réalisée pour la recherche des phytoplasmes de la vigne.

Préparation et distribution du mélange réactionnel :

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en µL)
eau ultra pure			3
QT Mix PCR	1 X	2 X	12,5
mapFD-F	0,20 µM	10 µM	0,5
mapFD-R	0,20 µM	10 µM	0,5
mapFD-FAM	0,20 µM	10 µM	0,5
mapBN-F	0,20 µM	10 µM	0,5
mapBN-R	0,20 µM	10 µM	0,5
mapBN-VIC	0,20 µM	10 µM	0,5
VITIS-F	0,20 µM	10 µM	0,5
VITIS-R	0,20 µM	10 µM	0,5
VITIS-Cy5	0,20 µM	10 µM	0,5
Mélange réactionnel			20 µL
Extrait d'ADN			5 µL
Volume final			25 µL

Programme du thermocycleur :

Activation*	95°C	15 min
45 cycles		
Dénaturation	94°C	1 min
Hybridation/Elongation**	59°C	1 min 30 sec

*la température et la durée d'activation de DNA polymérase dépendent du kit enzymatique utilisé.

**l'acquisition de fluorescence émise se fait généralement à chaque cycle en fin de phase d'élongation.

8. Résultats

8.1. Validation de l'analyse

La validation des analyses s'effectue en observant les résultats des amplifiats générés à partir des différents témoins. Une série d'analyses (même réaction de PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni :

- **Validation de la conformité des témoins**

Type de contrôle		Résultats attendus	Interprétation
E-	Témoin négatif d'extraction	NEGATIF	Il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase de broyage / extraction d'ADN, pas de faux-positifs générés à cette étape.
A-	Témoin négatif d'amplification	NEGATIF	Il n'y a pas eu de contamination de la série d'échantillons lors de la phase de préparation du mélange réactionnel / addition des extraits d'ADN à tester, pas de faux-positifs générés à cette étape.
E+	Témoin positif d'extraction	POSITIF	L'ensemble des conditions mises en œuvre pendant l'analyse ou l'extraction ont permis de produire des solutions d'acides nucléiques amplifiables à partir des échantillons.
A+	Témoin positif d'amplification	POSITIF	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR a permis l'amplification des cibles du test en excès.
A+ LR	Témoin d'amplification en limite de répétabilité	POSITIF	L'ensemble des conditions mises en œuvre pour l'amplification par PCR a permis l'amplification de la cible du test en limite de répétabilité.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne sont pas respectées, la série d'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de la série d'analyse doit être réitérée.

- **Détermination du Ct vigne de référence**

Le Ct vigne de référence est calculé de la façon suivante :

$$Ct_{ref} \text{ vigne} = \text{moyenne des Ct vigne obtenus au cours d'une campagne d'analyses pour les échantillons positifs} + 5 \text{ cycles.}$$

8.2. Interprétation des résultats

Si la série d'analyses est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des prises d'essai testées au cours de la même réaction de PCR.

Le seuil de répétabilité est établi à chacune des séries d'amplification (« runs »). Ce dernier est égal au Ct du témoin positif à la limite de répétabilité (A+ LR) : Ct_{A+LR} .

Pour chaque échantillon, lorsqu'une augmentation exponentielle de la fluorescence est observée pour la cible « FD » ou/et pour la cible « BN », le résultat est considéré en fonction du seuil de répétabilité (voir ci-dessous).

Tableau de présentation des règles de décision pour l'interprétation des résultats du test :

Amplification FD et/ou BN	Amplification Vigne	
	Ct vigne < Ct _{ref} vigne	Ct vigne ≥ Ct _{ref} vigne
Absence de courbe caractéristique	Négatif FD et/ou BN (1)	Non interprétable Si possible, l'extraction doit être renouvelée avant d'émettre le rapport d'analyse. (5)
Ct FD ≤ Ct A+ LR	Positif FD (2)	
Ct FD > Ct A+ LR	L'amplification doit être renouvelée comme prévu dans le schéma de détection. A l'issue du renouvellement des amplifications, - si au moins une amplification (2) + commentaire (3) - si pas d'amplification (1) + commentaire (4)	Non interprétable Si possible, l'extraction doit être renouvelée avant d'émettre le rapport d'analyse. (5)
Ct BN < 45	Positif BN (2)	

8.3. Formulation des résultats

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative. Les mentions suivantes sont obligatoires :

- méthode d'analyse utilisée,
- groupe de phytoplasmes (16SrV ou 16SrXII) auquel est lié le résultat,
- « positif », « négatif » ou « non interprétable »,
- dans le cas d'une 1^{ère} amplification au-delà de la limite de détection : le commentaire (3) ou (4) en fonction du cas.

Par exemple, le résultat final peut ainsi être formulé et en fonction des cas :

Méthode d'analyse :

« Détection des phytoplasmes du groupe [**préciser 16SrV (Flavescence dorée) ou 16SrXII (Bois noir)**] par PCR triplex en temps réel sur vigne. »

Libellés :

Résultat (1) : « Test négatif - Phytoplasme non détecté dans l'échantillon analysé »

Résultat (2) : « Test positif - Phytoplasmes détectés dans l'échantillon analysé »

Résultat (5) : « Test non interprétable – La qualité et/ou la quantité de l'extrait d'ADN ne permettent pas de conclure quant à la présence ou non de phytoplasmes dans l'échantillon analysé »

A mettre en commentaires selon les cas :

Commentaire (3) : « La cible « Flavescence dorée » a été amplifiée au-delà de la limite de répétabilité dans [**Préciser le nombre d'amplification 2 ou 3**] tubes / 3. »

Commentaire (4) : « La cible « Flavescence dorée » a été amplifiée au-delà de la limite de répétabilité dans 1 tube / 3 mais cette amplification n'a pas pu être reproduite. »

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les phytoplasmes sont des parasites stricts, les structures cellulaires hôtes sont indispensables à leur survie. Il est donc suffisant de détruire ou de déstructurer les tissus végétaux constituant l'échantillon pour éviter leur maintien et éventuellement leur dissémination.

Par ailleurs, les insectes vecteurs peuvent constituer une source de dissémination.

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
MOA 022	Techniques qualitatives d'amplification enzymatiques des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR en temps réel - Détection et identification des organismes phytopathogènes.
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
Décret du 9 juillet 2003	relatif à la lutte contre la Flavescence dorée de la vigne et contre son vecteur. Journal officiel n°167 du 22 juillet 2003, p 12362.
Rapport d'évaluation FD_BN2009	Évaluation de la PCR triplex en temps réel pour la détection des phytoplasmes de la vigne – Flavescence dorée et Bois noir
Rapport GRAFDEPI REP 001	Euphresco II – GRAFDEPI – WP3: Validation of diagnostic procedures.
GLO 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**(4), 1153-1169.

Pelletier C., Salar P., Gillet J., Cloquemin G., Very P., Foissac X., Malembic-Maher S., 2009. Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis* **48** (2), 87-95.

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 de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
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.