

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA006 Version 3

Consultation

Détection des phytoplasmes du groupe 16SrV (Flavescence dorée) et du groupe 16SrXII (Bois noir) de la vigne - PCR triplex en temps réel

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence : Mandat « Phytoplasmes sur toutes matrices »

Historique de la méthode

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

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
VV/98/02 version a	Sans objet	1998	Version initiale
VV/98/02 version b	majeures	2001	Passage d'un test TAS-ELISA à un test BIOTINE-ELISA.
VV/04/10 version a	majeures	Mars 2004	Passage à un test de biologie moléculaire : PCR multiplex gigogne
MOA 006 Partie B version 1a	majeures	Juin 2010	Passage à une PCR triplex en temps réel
MOA 006 Partie B version 1b	mineures	Août 2010	Quelques suggestions ont été ajoutées entre parenthèses et des modifications orthographiques ont été réalisées par rapport à la version 1a de la présente méthode. Une alternative à la réalisation de l'amplification proposée dans la précédente version est présentée dans cette version.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
MOA 006 version 2a	majeures	Septembre 2014	<p>La méthode de détection des phytoplasmes de la vigne par PCR multiplex gigogne décrite dans la version 1b (Partie A) de la présente méthode a été supprimée pour défauts de reproductibilité.</p> <p>Le domaine d'application de la méthode a été restreint aux pétioles et aux nervures primaires. Le LNR peut proposer de tester différents types de matériel (ex. : autres parties du cep de vigne, vecteurs).</p> <p>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 sont précisées.</p> <p>Une seule modalité d'amplification des extraits ADN a été retenue: le nombre de puits à déposer est fixé à un lors de la première analyse.</p> <p>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.</p>
MA 006 version 3*	majeures		<p><u>Extraction ADN :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Suppression du β-mercapto éthanol ; - Phase de clarification déplacée après la phase d'incubation à 65°C ; - Réduction des temps d'agitation et de centrifugation ; - Augmentation et harmonisation des vitesses de centrifugation - Possibilité d'utiliser le kit NucleoMag® Plant (Macherey-Nagel) ou autre kit d'extraction d'ADN ayant montré des performances équivalentes. <p><u>PCR :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Changement de la température d'hybridation à 60°C ; - Changement du fluorophore pour la sonde BN en notant que, de façon générale, le choix des fluorophores dépend des filtres disponibles sur le thermocycleur utilisé. - Changement de master mix et possibilité d'utilisation d'autre master mix de performance équivalente; - Réduction des temps d'amplification ; - Diminution du nombre de cycles. <p>Quelques modifications de forme pour amener de la clarté et harmoniser par rapport aux autres méthodes Anses.</p>

*La version 3 a fait l'objet d'une consultation du au 2023 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été validée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux– Unité bactériologie, virologie et OGM

Laboratoire National de Référence : **Mandat « Phytoplasmes sur toutes matrices »**

Adresse : 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers CEDEX 01

Contact : lsv.ubvo@anses.fr

La méthode de PCR triplex en temps réel a initialement été développée conjointement entre le LDA 71 de Mâcon, l'UMR 1090 « Génomique, Diversité, Pouvoir pathogène » de l'INRA de Bordeaux et le LNPV de Colmar (Pelletier *et al.*, 2009). Le travail d'évaluation avait été effectué par l'équipe 'Virologie-Phytoplasmiologie' du Laboratoire de la Santé des Végétaux (Rapport d'évaluation de la PCR triplex en temps réel pour la détection des phytoplasmes de la vigne –Flavescence dorée et Bois noir – Juin 2009).

Le travail d'optimisation de la présente version, de validation et de révision a été effectué par l'équipe 'Virologie-Phytoplasmiologie' de l'unité UBVO du Laboratoire de la Santé des Végétaux (Rapport de caractérisation et de validation de la méthode MA006 version 3).

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	4
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	10
5.1 Eau.....	10
5.2 Extraction d'ADN	10
5.3 Oligonucléotides	11
5.4 Kit de PCR en temps réel	11
5.6 Autres consommables à usage unique	11
5.7 Contrôles et témoins.....	12
6. Appareillage et matériels	13
7. Échantillons	15
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	15
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	15
8. Mode opératoire	17
8.1 Préparation des échantillons pour analyse – Prise d'essai	17
8.2 Extraction de l'ADN	18
8.3 PCR triplex en temps réel – Amplification des ADN.....	19
9. Résultats	21
9.1 Contrôle de la validité des résultats	21
9.2 Calcul et expression des résultats	23
10. Caractéristiques de performance de la méthode	25
Annexe 1 : Solution et tampon	28
Bibliographie	29

Introduction

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). Les symptômes de ces maladies évoquent une mauvaise circulation de la sève et le transport défectueux des produits de la photosynthèse depuis les feuilles vers les rameaux : enroulement de feuilles, anomalies de coloration des limbes et des nervures, absence partielle ou totale de stockage des réserves (aoûtement) manifestée par des sarments flexueux et le dépérissement d'une partie ou de la totalité de la souche (Boudon-Padieu, 2002 ; [Grapevine flavescence dorée phytoplasma \(PHY64\)\[Photos\] EPPO Global Database](#)).

La FD est présente dans les pays viticoles du sud/sud-est de l'Europe. En France, elle est signalée depuis 1955 et présente dans la grande majorité des régions viticoles.

Par rapport à la version précédente, la méthode de détection présentée dans ce document a fait l'objet d'une optimisation et de modifications détaillées dans la partie 'Historique de la méthode' en page 3. Toutefois, les performances de cette version étant similaires à celles de la version précédente, les alternatives déjà validées et, le cas échéant, autorisées restent utilisables.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

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

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

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.

La mise en œuvre de la méthode doit se faire dans le respect des dispositions réglementaires en vigueur au moment de son utilisation.

1. Objet et domaine d'application

La présente méthode a pour objet la détection des phytoplasmes des groupes 16SrV (Flavescence dorée) et 16SrXII (Bois noir) sur vigne. La présence de ces phytoplasmes est mise en évidence par un test de détection par PCR triplex en temps réel. Elle s'applique sur pétioles et nervures centrales. 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. La méthode ne s'applique pas sur végétaux en dormance (ex : bouture, plante à feuilles caduques en repos végétatif).

La méthode décrite est qualitative. Elle permet de détecter la présence des phytoplasmes de la vigne dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais ne permet pas de quantifier la cible dans l'échantillon analysé. Elle ne permet pas de distinguer le phytoplasme de la Flavescence dorée d'autres phytoplasmes du groupe 16SrV ou de typer ce dernier.

2. Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes.

3. Termes, sigles et définitions

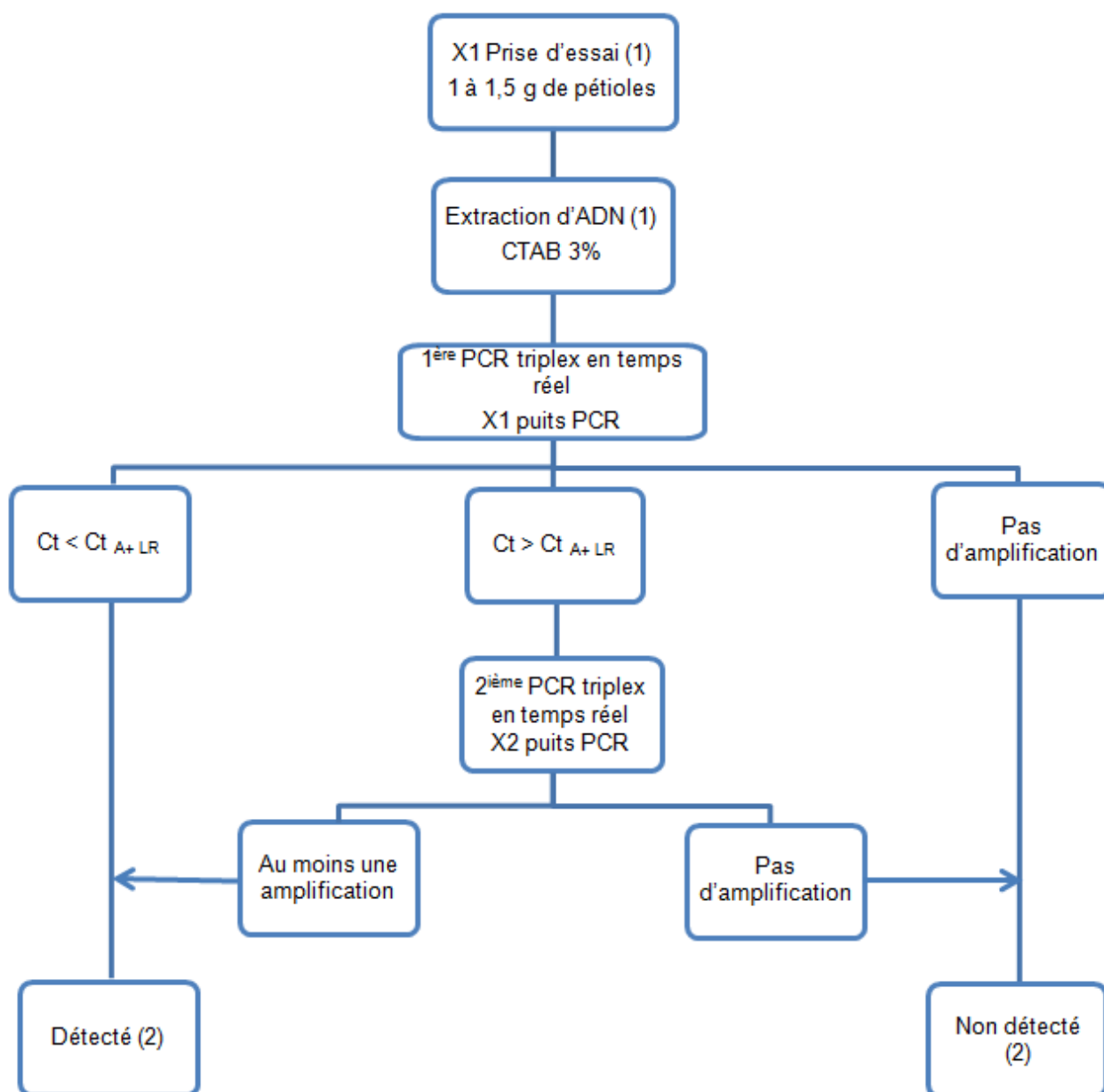
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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

4. Principe de la méthode

La méthode est une méthode de biologie moléculaire. L'extraction de l'ADN total est réalisée avec un protocole au CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide). La détection des phytoplasmes de la FD et du BN se fait ensuite par PCR en temps réel triplex avec l'amplification simultanée des 2 séquences ADN spécifiques du gène *map* des phytoplasmes responsables de la FD et/ou du BN et d'un contrôle interne endogène « vigne » (amorces et sonde ciblant l'ARNt Leucine) permettant de valider échantillon par échantillon la qualité et la quantité de l'extrait ADN.

Le principe de la méthode pour la détection de la FD est présenté dans le schéma ci-dessous :



(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 9.2)

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

Les règles de validation et d'interprétation des résultats sont détaillées pour la FD et le BN au point 9.

5. Réactifs

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

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, par le nettoyage, par la stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminant (ADN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer 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.

Voir les recommandations générales définies dans la MOA 022.

5.1 Eau

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

5.2 Extraction d'ADN

La méthode de la présente version propose un protocole au CTAB (Cetyl TrimethylAmmonium Bromide) 3% où le β -mercaptoéthanol a été supprimé et les temps de centrifugation, vortexage et retournement ont été réduits par rapport aux versions précédentes.

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

- tampon de broyage CTAB 3% (annexe 1);
- chloroforme/alcool isoamylique (24/1) (qualité biologie moléculaire - annexe 1);
- isopropanol;
- éthanol à 70%;

Toutefois, l'extraction d'ADN pourra aussi être réalisée avec le kit NucleoMag® Plant (Macherey-Nagel) ou avec toute autre méthode ayant montré comme lui des performances équivalentes à la MOA006 ver2a (précédente version) et à la méthode décrite dans le présent document.

5.3 Oligonucléotides

Cibles	Amorces et Sondes	Séquences adaptées de Pelletier <i>et al.</i> (2009)
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-HEX</i>	5'-ATT TGA TGA AAC ACG CTG GAT TAA-3' 5'-TCC CTG GAA CAA TAA AAG TYG CA-3 HEX- AAA CCC ACA AAA TGC –MGB ¹
Vigne	<i>VITIS-F</i> <i>VITIS-R</i> <i>VITIS-Cy5</i>	5'-AAA TTC AGG GAA ACC CTG GAA-3' 5'-CCC TTG GTT GTT TTC GGA AA-3' Cy5- CtG <u>ag</u> C <u>c</u> AA <u>atc</u> C –BHQ-2 ^{2;3}

¹ : MGB = Minor groove binder

² : a, t, g, c = base LNA (Locked nucleic acid[®])

³ : BHQ-2 = Black hole quencher[®]

Les amorces doivent être au minimum de qualité RP cartridge et la sonde de qualité HPLC (exemples des critères de qualité du fournisseur Eurogentec). Dans le cas où d'autres fournisseurs proposent des critères de qualité différents, le laboratoire doit s'assurer de l'équivalence du niveau de performance. A noter que les sondes telles que décrites dans Pelletier *et al.* (2009) peuvent également être utilisées. Les fluorophores utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que pour chaque sonde le fluorophore extincteur soit adapté au rapporteur associé, que d'une sonde à l'autre les fluorophores rapporteurs soient différents et que l'appareil de PCR en temps réel employé soit compatible.

5.4 Kit de PCR en temps réel

La présente méthode a été caractérisée et validée par le Laboratoire National de Référence (LNR) avec le kit PerfeCTa[®] qPCR ToughMix Low Rox (Quantabio) référence catalogue Quantabio novembre 2022 n°95114.

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 ou sa version précédente.

5.6 Autres consommables à usage unique

- Cônes à filtre pour pipettes de volumes adaptés
- Microtubes stériles 2 mL et 1,5 mL en fonction des étapes des protocoles

- Microtubes ou capillaires (qualité biologie moléculaire) de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits
- 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.

5.7 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel requiert 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 :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole,
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- Les volumes prélevés à l'aide des 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 contrôles et 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). Il permet de contrôler la qualité de la manipulation ainsi que le bon fonctionnement du matériel.

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

Réaction de PCR réalisée avec de l'eau ultra pure 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 cibles (« 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 cibles est détectable de façon répétable par la méthode dans les conditions de l'essai (1 puits au minimum).

Ces témoins sont traités à l'identique des autres échantillons.

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA022.

En cas d'anomalies constatées sur un contrôle, les dispositions de la MOA022 doivent être respectées.

6. Appareillage et matériels

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

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA 022 version en vigueur. Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 version en vigueur.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau 1 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 1 : Erreurs maximales tolérées

Grandeur	EMT
Volume	EMT définies par la MOA022 version en vigueur ou par la norme NF EN ISO 8655-2
Masse	EMT = $\pm 10\%$
Température	Thermobloc, bain à sec : EMT = $\pm 5^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage

Thermocycleur : le constat de qualification (aptitude à l'usage attendu) se fera sur la base des résultats obtenus par le biais d'un test biologique et/ou d'une vérification métrologique.

En plus de l'appareillage courant, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

Prise d'essai

- Balance de portée et d'exactitude adaptées à la pesée des échantillons (ex : balance de classe II) ;
- Tout outil éventuellement nécessaire pour prélever l'échantillon de laboratoire et effectuer une fragmentation sommaire des tissus végétaux : sécateur; ciseaux, emporte-pièce... ;
- Presse pneumatique (ou autre système de broyage pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations)
- 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 d'ADN selon le protocole CTAB

- Hotte chimique ou sorbonne
- Verrerie pour les préparations et le stockage (flacons bouchonnés et éprouvettes) pouvant être autoclavée ;
- pH-mètre ;
- Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge relative d'environ 1000 g à 13000 g et rotor adapté pouvant recevoir des tubes plastiques de 1,5 et 2 mL
- Thermobloc ou bain-à-sec (température 65°C) (pour la lyse cellulaire)
- Agitateur de tubes de type Vortex

Equipement pour l'amplification

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des rapporteurs utilisés (par exemple, ceux des sondes décrites au point 5.3 FAM, HEX, Cy5)

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- La méthode ne s'applique pas sur végétaux en dormance (ex : bouture, plante à feuilles caduques en repos végétatif) ;
- Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni en cours de décomposition. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi ;
- Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage fermé et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons ;
- Taille de l'échantillon suffisante pour réaliser les prélèvements nécessaires ;
- Présence d'une fiche de demande d'analyse : formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons, demande de confirmation auprès du LNR... Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

Dans les cas contraires (échantillon en quantité insuffisante (cf. point 8.1), échantillon dégradé), le laboratoire informe le client dans les plus brefs délais en précisant les raisons du refus d'analyse.

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 7 jours calendaires pour des échantillons prélevés dans de bonnes conditions.

En attente de traitement, l'échantillon devra être conservé à 5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Cas d'un échantillon négatif : 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 quinzième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse pour éventuellement permettre la demande d'une analyse contradictoire par le client.

Cas d'un échantillon positif : l'ensemble des reliquats pertinents (équivalent de 1 à 2 prises d'essai, extrait d'ADN) 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.

Les conditions de conservation des différents types de reliquats d'échantillon à conserver en vue d'éventuelles analyses complémentaires sont présentées dans le tableau 2 ci-après :

Tableau 2 : Conditions de conservation des échantillons

Etapas	Type de reliquat	Conservation			Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant		
		Résultat	Durée	Conditions			
Echantillon ou Prise d'essai	Végétal ou Pétioles /Nervures principales	Négatif	15 jours après envoi du rapport	+5°C ou ≤-18°C jusqu'à obtention du résultat puis ≤-18°C	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide		
		Autre que négatif	12 mois				
Broyage	Broyat végétal	Négatif	15 jours après envoi du rapport		+5°C ou ≤-18°C jusqu'à obtention du résultat puis ≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide	
		Autre que négatif	12 mois				
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	Négatif	15 jours après envoi du rapport			+5°C ou ≤-18°C jusqu'à obtention du résultat puis ≤-18°C	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur rapide
		Autre que négatif	12 mois				

8. Mode opératoire

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

8.1 Préparation des échantillons pour analyse – 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 prélevé à partir de l'échantillon pour analyse. Une 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 ».



Figure 1 : Symptômes de jaunisses de la vigne sur feuilles. Cabernet sauvignon (cépage rouge) sur la gauche ; Chardonnay (cépage blanc) sur la droite (source : SRAL PACA).

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.

Entre chaque échantillon, changer les coupelles de pesée, et nettoyer la paillasse avec de l'hypochlorite de sodium ou un produit similaire afin d'éviter les contaminations croisées (destruction des traces d'ADN) et désinfecter les petits matériels de prélèvement, scalpels, ciseaux, sécateurs, etc., par trempage d'une durée d'au moins 2 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium d'une concentration d'au moins 2,6 % de chlore actif puis rincés abondamment à l'eau déminéralisée (élimination des traces d'ADN).

Déposer la prise d'essai dans un sac de broyage en plastique (avec gaze pour la filtration des particules grossières).

Remarque : Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les prélèvements au réfrigérateur pendant 24 h ou au congélateur pour une durée supérieure à 24 h.

8.2 Extraction de l'ADN

Broyage

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

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

Clarification

Clarifier l'extrait par centrifugation. A titre indicatif : 10 min à environ 1 000 g après homogénéisation

Dénaturation des membranes et libération de l'ADN des phytoplasmes

Transférer 1 mL de surnageant dans un nouveau tube de 2mL.

Incuber pendant environ 20 min à environ 65°C afin de permettre la dénaturation des membranes par le CTAB.

Purification

Ajouter sous la sorbonne 1 mL d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique (ratio 24/1) (voir annexe 1).

Vortexer correctement jusqu'à obtenir une émulsion (chloroforme insoluble).

Centrifuger environ 5 min à 13000 g environ 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 750 µL d'isopropanol glacé (conservé au congélateur).

Agiter lentement par retournements du tube jusqu'à homogénéisation.

Remarque : Il est possible d'arrêter momentanément l'analyse à ce stade en conservant les tubes au congélateur.

Centrifuger environ 5 min à 13000 g environ 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) puis centrifuger environ 5 min à 13000 g environ.

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 ultra pure. 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 doivent être congelées si l'utilisation n'est pas immédiate.

8.3 PCR triplex en temps réel – Amplification des ADN

L'amplification nécessite 3 couples d'amorces (cf. point 5.3), 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 point 9.1.2). A chacun de ces couples est associée une sonde permettant la mise en évidence d'une éventuelle amplification (cf. point 5.3).

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

La composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR triplex en temps réel pour la détection des phytoplasmes de la vigne est présentée dans le tableau ci-après :

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour amplification par PCR triplex en temps réel

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en μL)
eau ultra pure			3
PerfeCTa [®] qPCR toughMix Low Rox* (Quantabio)	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

Conditions de PCR

Les différents paramètres de l'amplification par PCR triplex en temps réel pour la détection des phytoplasmes de la vigne sont présentés dans le tableau ci-après :

Tableau 4 : Paramètres d'amplification

	Températures	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation*	95°C	3 min	1 cycle
Dénaturation	95°C	15 s	40 cycles
Hybridation et Elongation**	60°C	60 s	

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

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

9. Résultats

Pour la détermination de la ligne de seuil (threshold), il est recommandé d'utiliser la détermination automatique réalisée avec le logiciel du thermocycleur.

Une valeur de Ct doit être accompagnée d'une courbe de type exponentiel (en échelle linéaire et exponentielle) pour être prise en compte.

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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. Une série d'analyses (même réaction de PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions ci-après est réuni.

Validation de la conformité des témoins

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

Tableau 5 : Conditions de validation des témoins

Type de contrôle		Résultats attendus ¹	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.

¹ : Les règles de décision pour conclure à un résultat 'positif' ou 'négatif' sont formulées dans le tableau 6.

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 :

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

9.2 Calcul et expression 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.

La valeur du Ct du témoin positif à la limite de répétabilité (A+ LR) : Ct A+LR est établie à chacune des séries d'amplification (« run »). Elle permet l'interprétation des résultats des échantillons analysés dans la série.

Interprétation des résultats

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 6 : 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	Non interprétable Si possible, l'extraction doit être renouvelée
Ct FD ≤ Ct A+ LR	Positif FD	
Ct FD > Ct A+ LR	L'amplification doit être renouvelée comme prévu dans le schéma de détection (cf. point 4). A l'issue du renouvellement des amplifications, - si au moins une amplification POSITIF FD + commentaire (1) - si pas d'amplification NEGATIF FD + commentaire (2)	Non interprétable Si possible, l'extraction doit être renouvelée (3)
Ct BN < 40	Positif BN	

Formulation des résultats

Le résultat final du test est exprimé sous forme qualitative : « positif/négatif/indéterminé », « détecté/non détecté/indéterminé » ou mention équivalente.

La référence de la méthode d'analyse utilisée sera mentionnée, par exemple: « Détection des phytoplasmes du groupe **[préciser 16SrV (Flavescence dorée) ou 16SrXII (Bois noir)]** par PCR triplex en temps réel sur vigne - méthode MA006 ».

Pour les résultats 'indéterminé', un commentaire pourra être apporté précisant, par exemple, que « 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 pour les échantillons proches de la limite de répétabilité :

Commentaire (1) : « 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 (2) : « 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. »

Commentaire (3) : « 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 »

10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-après est extraite des documents suivants :

- Pelletier *et al.*, 2009 **(A)** ;
- Loiseau, 2015 **(B)** ;
- de la version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA006 version 3 « Détection des phytoplasmes du groupe 16SrV (Flavescence dorée) et du groupe 16SrXII (Bois noir) de la vigne - PCR triplex en temps réel » établi par l'ANSES-LSV en janvier 2023 **(C)**.

Tableau 7 : Synthèse des caractéristiques de performance de la MA006 version 3

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Spécificité	Capacité de la méthode à rendre un résultat négatif lorsque la cible n'est pas présente	100%	(A) confirmé par (B) Des extraits ADN de pervenche saine (<i>Catharanthus roseus</i>), de fève (<i>Vicia faba</i>), de différents cultivars de vignes saines (<i>Vitis vinifera</i> cv Pinot noir, Gewurztraminer, Chardonnay, Riesling, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon) ainsi que des isolats de phytoplasmes appartenant à d'autres groupes phylogénétiques (2 isolats des groupes 16SrI et 16SrII, 1 isolat des groupes 16SrIII, 16SrVI et 16SrVII et 3 isolats du groupe 16SrX) ont été testés.

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Spécificité diagnostique	Pourcentage d'échantillons détectés positifs parmi les non cibles.	93,3%	<p>(B)</p> <p>Essai inter-laboratoires de validation organisé par l'ANSES-LSV avec 14 participants, chaque participant a testé les extraits ADN non cibles suivants : Aster yellows 16SrI-B, 4 vignes saines, Ash yellows 16SrVII-A, Rubus stunt 16SrV-E, Grapevine yellows GY-U 16SrIII-B, Jujube witches' broom 16SrV-B.</p> <p>Les quelques faux positifs obtenus n'ont pas été reproduits sur un non cible en particulier. Le risque de faux positifs n'est pas lié au manque de spécificité de la méthode mais au risque accru de micro-contamination du fait de la sensibilité analytique élevée de la méthode.</p>
Inclusivité / Sensibilité relative	Pourcentage d'échantillons détectés positifs parmi les cibles.	100%	<p>(C)</p> <p>15 extraits ADN de vignes contaminées par des phytoplasmes du groupe 16SrV (Flavescence dorée) : FD1 (4xM50, 1xvariant M50), FD2 (1xM38, 4xM54), 3xFD3, PGY (1xM36, 1xM88)</p> <p>et 15 extraits ADN de vignes contaminées par des phytoplasmes du groupe 16SrXII (Bois noir) : isolats provenant d'Alsace, Auvergne, Auvergne-Rhône-Alpes (x3), Franche Comté, Grand Est (x2), Limousin, Lorraine, Provence Alpes Côtes d'Azur (x2), Pays de la Loire (x2), Poitou Charentes</p> <p>Chaque extrait a été testé 3 fois.</p>

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité analytique	Niveau de dilution le plus important pour lequel l'ensemble des répétitions est positif.	FD : 2×10^{-2} (17,5 copies/ μ L) BN : 2×10^{-2} (4 à 5 copies/ μ L)	(C) Gamme de dilution à 5 niveaux d'extraits ADN positifs pour l'un ou l'autre des groupes de phytoplasmes dans de l'extrait ADN de vigne saine. Chaque niveau a été testé 6 fois.
Répétabilité	Etroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec un matériel d'essai identique dans des conditions identiques.	93%	
Reproductibilité	Etroitesse d'accord entre des résultats successifs et indépendants obtenus avec un matériel d'essai identique par des opérateurs de différents laboratoires utilisant un équipement différent.	93,3%	(B) 3 gammes de dilution à 5 niveaux d'extraits ADN positifs pour les phytoplasmes du groupe 16SrV dans de l'extrait ADN de vigne saine. Chaque niveau a été testé 1 fois par 5 laboratoires différents.

Annexe 1 : Solution et tampon

Tampon d'extraction CTAB 3%

Nom produit	Quantité pour 1L
Cethyl triméthylammonium bromide ou bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB)	30 g
Chlorure de sodium (NaCl)	81,81 g
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	7,44 g
2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol, hydrochloride (Tris-HCl ou Trizma base)	12,1 g
eau déminéralisée	700 mL
Ajuster le pH à 8,0.	
eau déminéralisée	Qsp 1L

Chloroforme/Alcool isoamylique 24/1

Nom produit	Quantité
Chloroforme	24 mL
Alcool isoamylique	1 mL

Bibliographie

Anses, LSV UBVO, Version 1 du rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse MA006 version 3 « Détection des phytoplasmes du groupe 16SrV (Flavescence dorée) et du groupe 16SrXII (Bois noir) de la vigne - PCR triplex en temps réel » - Janvier 2023

Boudon-Padieu E., 2002. Flavescence dorée de la vigne : connaissances et nouvelles avancées en épidémiologie, étiologie et diagnostic. *ATTI Giornate Fitopatologica* **1**, 15-34.

[Grapevine flavescence dorée phytoplasma \(PHYP64\)\[Photos\]| EPPO Global Database consulté le 18/01/2023](#)

Loiseau, M., 2015. European interlaboratory comparison of detection methods for “flavescence dorée” phytoplasma: preliminary results. *Phytopathogenic Mollicutes* **5** (1s): S35-S37.

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