



**Détection de
Bursaphelenchus xylophilus
par PCR temps réel
dans un groupe d'insectes
vecteurs**

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

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

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

Dates de validité du présent document

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

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 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.

| n° méthode Numéro de la version | Consultation publique | | Validité | |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------|-----|
| | Début | Fin | Début | Fin |
| MOA020 partie C version 1a | Novembre 2014 | Novembre 2014 | Janvier 2015 | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| PREAMBULE..... | 4 |
| Objet des méthodes officielles..... | 4 |
| Glossaire, abréviations et documents connexes | 4 |
| Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus..... | 4 |
| Échantillonnage et échantillon | 4 |
| Modification des méthodes officielles | 4 |
| Considérations d'ordre métrologique | 5 |
| Obligations réglementaires et limites de responsabilité | 5 |
| Revue des méthodes officielles, amendement et modification..... | 6 |
| ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS..... | 7 |
| PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE | 8 |
| Modifications | 8 |
| Améliorations | 8 |
| DESCRIPTION DE LA METHODE..... | 9 |
| 1. Objet..... | 9 |
| 2. Domaine d'application | 9 |
| 3. Présentation schématique de la détection..... | 10 |
| 4. Matériel et consommables | 10 |
| 4.1. Conditionnement des insectes pour analyse..... | 10 |
| 4.2. Etape d'extraction de l'ADN et détection par PCR temps réel..... | 10 |
| 5. Contrôles et témoins | 11 |
| 6. Prise d'analyse | 12 |
| 7. Mode opératoire | 12 |
| 7.1. Conditionnement des insectes | 12 |
| 7.2. Extraction d'ADN | 13 |
| 7.3. Détection par PCR temps réel | 13 |
| 8. Résultats..... | 14 |
| 8.1. Validation de l'analyse..... | 14 |
| 8.2. Interprétation des résultats..... | 15 |
| 8.3. Formulation du résultat d'analyse | 15 |
| 9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants..... | 15 |
| 10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés | 15 |
| REMERCIEMENTS | 16 |
| LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE..... | 16 |
| BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE | 17 |

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 (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

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 u |
| Température | incubateur : EMT = ± 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = ± 4°C congélateur : ≤ -18°C congélateur froid intense : ≤ -65°C |
| Longueur | EMT = 10% |
| Temps | EMT = 10% |

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

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

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

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

ORIGINE DE LA METHODE ET REMERCIEMENTS

La présente méthode a été évaluée et rédigée par le Laboratoire de la Santé des Végétaux, unité de nématologie du Rheu en se basant sur les outils de PCR en temps réel décrits dans les publications de François *et al.*, 2007 et de loos *et al.*, 2009, et déjà mis en œuvre dans la MOA 20 partie A concernant la détection de *Bursaphelenchus xylophilus* dans un extrait de bois de conifères.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité de coordination de la référence du laboratoire.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

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

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

MODIFICATIONS

Sans objet (première version publiée).

AMELIORATIONS

Sans objet (première version publiée).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Le nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970 est l'agent responsable du dépérissement des pins. Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôtes de ce nématode.

Les nématodes sont transmis d'une plante-hôte à une autre par un coléoptère du genre *Monochamus*.

Le transport de bois infesté et/ou du vecteur contaminé constitue le mode de dissémination du parasite le plus probable au niveau international.

Le nématode visé est un organisme nuisible de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29 CE).

1. Objet

La présente méthode décrit les modalités de détection du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, dans son insecte vecteur, un coléoptère du genre *Monochamus*. Elle repose sur une détection directe du nématode dans les insectes en réalisant une extraction d'ADN globale puis une analyse utilisant la technique de PCR en temps réel.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode est applicable aux insectes du genre *Monochamus* qui sont vecteurs du nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus*.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Sans objet

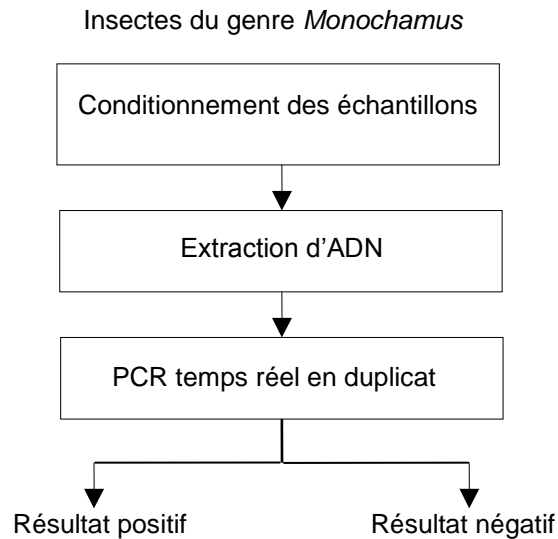
Grandeur de l'objet soumis à analyse

La totalité ou une partie de l'échantillon reçu est analysée par fraction de 10 insectes maximum.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

Les insectes analysés doivent être morts avant ouverture de leur contenant (insecticide dans le piège et congélation si nécessaire).

3. Présentation schématique de la détection



4. Matériel et consommables

4.1. Conditionnement des insectes pour analyse

Le conditionnement des insectes pour analyse ne nécessite pas de matériel spécifique. Les consommables nécessaires au conditionnement pour analyse sont les suivants :

- Tubes 50 mL de type Falcon
- Scalpel

4.2. Etape d'extraction de l'ADN et détection par PCR temps réel

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, 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, sont suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définit les conditions qu'il juge les plus optimales.

1. Consommables :

- Billes d'acier de diamètre environ 1 cm
- Tampon PBS 1X (NaCl, Na₂HPO₄ 12H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O, eau) (cf. MOA REP001 version 1b)
- Kit d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons (insectes avec ou sans nématodes) est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce : kit QIAamp® DNA Blood maxi (Qiagen®) complété par le tampon ATL (Qiagen®). Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN préconisé (10 nématodes de *B. xylophilus* doivent être détectés dans un pool de 10 insectes vecteurs et la valeur du « Cycle threshold » (Ct) de la cible *B. xylophilus* doit être inférieure à 25).

- Oligonucléotides

| Cible | Amorces et sondes | Séquence 5' → 3' | |
|-----------------------------|-------------------------------|---|--|
| <i>B. xylophilus</i> | BsatF | TGACGGAGTGAATTGACAAGACA | |
| | BSatRV | AAGCTGAAACTTGCCATGCTAAA | |
| | BSatS | FAM-ACACCATTTCGAAAGCTAATCGCCTGAGA-BHQ1 | |
| | Contrôle interne (18s) | 18S uni-F | GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA |
| | | 18S uni-R | CCACCACCCATAGAATCAAGA |
| | | 18S uni-P | JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1 |

- Pré-mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl₂, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode (au minimum, vérifier la sensibilité et la spécificité).

Le protocole a été évalué en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics.

- Autres consommables à usage unique

- embouts de pipette avec et sans filtre de volume adapté,
- microtubes d'environ 2 mL,
- microtubes ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur temps réel utilisé,

2. Matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, bain-marie, ...), le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Agitateur à retournement
- Rotor à swing pour centrifugeuse pour tubes 50 mL
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage avec un logiciel permettant l'acquisition de fluorescence et l'évaluation automatique des cycles seuil.

5. Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- un témoin positif de processus (E+)¹ : extrait de *Monochamus* broyés dans du tampon PBS et contaminé artificiellement avec quelques individus de *B. xylophilus* (niveau proche du seuil de détection de la méthode, environ 10 nématodes cibles), traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

¹ Ce type de témoin peut être fourni par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux
Bursaphelenchus xylophilus, extraction, PCR temps réel, insectes vecteurs

- un témoin négatif de processus (E-) : extrait de *Monochamus* broyés dans du tampon PBS, non contaminé en *B. xylophilus*, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser ; ce contrôle peut éventuellement contenir des nématodes autres que *B. xylophilus*.
- un témoin positif de PCR (A+)¹ : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.
- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et l'absence de contamination pour le contrôle négatif).

6. Prise d'analyse

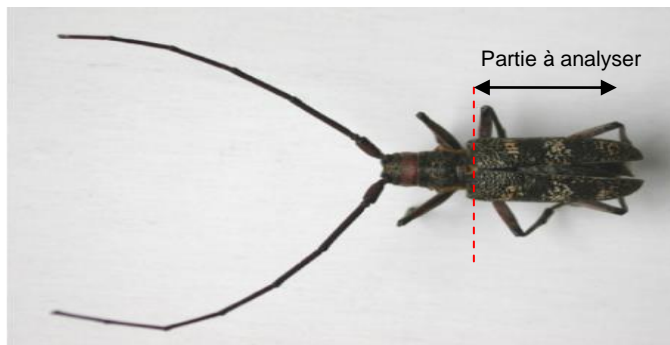
L'analyse est réalisée sur les parties postérieures d'insectes (maximum 10 par tube).

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.

7. Mode opératoire

7.1. Conditionnement des insectes

1. L'analyse porte sur au maximum 10 insectes regroupés par tube de 50mL.
2. La partie postérieure des insectes est prélevée à l'aide d'un scalpel comme schématisé ci-dessous.



3. Mettre dans un tube de 50 mL type Falcon, les parties postérieures prélevées.
4. Identifier les tubes à l'aide d'un marqueur indélébile (résistant au froid et à l'eau).

Remarque : il est possible de stopper l'analyse à ce stade en congelant (<-10°C) les tubes contenant les parties d'insectes à analyser.

5. Si besoin, décongeler le contenu des tubes ayant été au froid négatif.
6. Ajouter dans chacun des tubes :
 - 1 bille d'acier d'un diamètre d'environ 1 cm
 - 10 mL environ de tampon PBS 1X
7. Disposer les portoirs contenant les tubes de 50 mL dans un agitateur rotatif et mettre en agitation à faible vitesse (vitesse 30 à 40 tours/mn environ) pendant environ une heure.

¹ Ce type de témoin peut être fourni par l'unité de nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux
Bursaphelenchus xylophilus, extraction, PCR temps réel, insectes vecteurs

7.2. Extraction d'ADN

La présente méthode a été validée en utilisant le kit d'extraction d'ADN QIAamp® DNA Blood Maxi (Qiagen®) complété par le tampon ATL (Qiagen®). Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais s'agissant d'un réactif critique, les dispositions du paragraphe « modification des méthodes officielles » s'appliquent. En l'occurrence, le laboratoire doit apporter la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la méthode ci-dessous (10 nématodes *B. xylophilus* détectés dans un pool de 10 *Monochamus* avec une valeur du « Cycle threshold » (Ct) inférieure à 25).

1. Ajouter, par tube, 4500µL de tampon de lyse ATL (Qiagen®) + 500 µL de protéase du kit préalablement réhydratée selon les préconisations du fournisseur.
2. Homogénéiser par agitation.
3. Incuber les extraits environ 12 heures (1 nuit) à 56°C dans un bain thermostaté
4. Reprendre les tubes du bain thermostaté et procéder à une brève centrifugation ; ajouter 10 mL de tampon AL et bien vortexer
5. Incuber au moins 10 min à 70°C
6. Au terme des 10 minutes d'incubation, reprendre les tubes du bain thermostaté et procéder à une brève centrifugation ; ajouter 10 mL d'éthanol
7. Bien homogénéiser (vortex) et laisser reposer au moins 15 min
8. Transférer 15 mL du contenu du tube sur la colonne
9. Centrifuger 5 min à 3000 tours/min
10. Enlever l'éluât, replacer la colonne sur le collecteur
11. Transférer 10 mL du contenu du tube sur la colonne
12. Centrifuger 5 min à 3000 tours/min
13. Enlever l'éluât, replacer la colonne sur le collecteur
14. Ajouter 5 mL de tampon AW1
15. Centrifuger 1 min à 5000 tours/min
16. Ajouter 5 mL de tampon AW2
17. Centrifuger 15 min à 5000 tours/min
18. Ajouter 1 mL de tampon AE
19. Incuber quelques minutes à température ambiante puis centrifuger 1 minute à 5000 tours/min
20. Placer la colonne sur un tube de 50 mL propre identifié et ajouter 1 mL de tampon AE
21. Incuber quelques minutes à température ambiante puis centrifuger 5 minutes à 5000 tours/min.

Une partie des solutions ADN est transférée en plaque PCR pour la suite de la manipulation.

Les solutions ADN éluées (= S_{ADN}) sont analysées directement par PCR temps réel, ou bien sont congelées (<-10°C) jusqu'à leur analyse.

7.3. Détection par PCR temps réel

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais s'agissant d'un réactif critique, les dispositions du paragraphe « modification des méthodes officielles » s'appliquent. En l'occurrence, le laboratoire doit apporter au LNR la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

1. Préparation du mélange réactionnel :

Chaque extrait d'ADN est analysé **en duplicat**.

La composition du mélange réactionnel est la suivante :

| Réactifs | Concentration finale (volume final par puits : 20 µL) |
|--|--|
| Eau Ultra Pure | qsp 15 µL |
| Tampon de polymérase à ADN ou tampon de pré-mix commercial | 1 X* |
| Chlorure de magnésium | 5,5 mM* |
| Amorce BSatF | 0,3 µM |
| Amorce BSatR | 0,3 µM |
| Sonde BSatS | 0,1 µM |
| Amorce 18S uni-F | 0,3 µM |
| Amorce 18S uni-S | 0,3 µM |
| Sonde 18S uni-P | 0,1 µM |
| dNTPs | 200 µM / dNTP* |
| Taq polymérase | 0,025U/µL* |

* ou concentration fixée et optimisée par le fournisseur si un pré-mix du commerce est utilisé.

- Distribution du mélange réactionnel à raison de 15 µL par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur).
- Ajout de 5 µL de solution d'ADN à tester dans les puits PCR.
- Amplification

Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant :

| | | |
|---------------------------------|---------------|-----------|
| Dénaturation initiale | 10 min à 95°C | 35 cycles |
| Dénaturation | 15 sec à 95°C | |
| Hybridation - Elongation | 1 min à 60°C* | |

* acquisition de la fluorescence en fin d'élongation

8. Résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel. Pour être prise en compte, une courbe d'amplification doit être de type exponentiel.

8.1. Validation de l'analyse

1. Validation de l'amplification

L'amplification est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :

- le témoin négatif de PCR (A-) ne donne pas d'amplification ou bien donne une valeur de Ct \geq 25,
- le témoin positif de PCR (A+) donne une amplification avec une valeur de Ct $<$ 25.

2. Validation de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :

- le témoin négatif de processus (E-) ne génère pas d'amplification ou montre une amplification avec une valeur de Ct \geq 25,
- le témoin positif de processus (E+) génère une amplification avec une valeur de Ct $<$ 25.

Dans le cas où les résultats d'un ou plusieurs témoins ne sont pas conformes à ceux attendus (définis ci-dessus), l'analyse n'est pas validée et selon la non-conformité observée, toute ou partie de l'analyse est à refaire.

8.2. Interprétation des résultats

Lorsque la série d'analyses est validée par l'obtention de résultats conformes pour les différents témoins, les résultats des échantillons à analyser peuvent être interprétés de la façon suivante pour l'organisme cible recherché (test spécifique) :

| Prise d'essai | | Résultat de la prise d'essai |
|---------------|---------|--|
| Puits 1 | Puits 2 | |
| + | + | Positif |
| + | - | PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la deuxième amplification, le résultat est interprété comme positif. |
| - | - | <p>1/ Si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 30 est observée pour le test universel 18S uni pour la prise d'essai considérée, le résultat pour la prise d'essai considérée est négatif.</p> <p>2/ Si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct > 30 ou s'il n'est pas observé d'amplification pour le test 18S uni pour la prise d'essai considérée, refaire la PCR avec la solution d'ADN dilué au 1/10^e.</p> <p>Si le résultat de la 2^{ème} PCR est identique à celui de la 1^{ère} PCR, le résultat n'est pas interprétable. Une nouvelle analyse sur le reliquat de l'échantillon (si des insectes sont disponibles) est alors engagée. Si non ou si le résultat n'est pas interprétable, le client est informé qu'aucun résultat ne pourra être fourni.</p> |

+ : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*.

- : absence de courbe d'amplification exponentielle ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct ≥ 25 pour le test spécifique *B. xylophilus*.

Remarque : dans le cas où une amplification exponentielle est observée et que $25 \leq Ct \leq 30$ pour le test spécifique, le résultat de la prise d'essai considérée est négatif. Toutefois, lorsque cela est possible une nouvelle analyse est réalisée sur le reliquat d'échantillon, de préférence sur de nouveaux abdomens, ou à défaut sur les thorax restants.

Quand plusieurs fractions de 10 insectes sont analysées pour un même échantillon, si une des fractions obtient un résultat positif, l'échantillon est positif pour la détection de *B. xylophilus*.

8.3. Formulation du résultat d'analyse

Le résultat final de l'analyse est exprimé sous forme qualitative de la façon suivante :

« **Détection de *B. xylophilus* par PCR temps réel** » :

- « **Test négatif** » lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif pour l'organisme cible,
- « **Test positif** » lorsque le résultat de la prise d'essai est positif pour l'organisme cible.

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

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

10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction Générale de l'Alimentation au sein du ministère chargé de l'agriculture.

REMERCIEMENTS

Le laboratoire de la santé des végétaux remercie Messieurs D. PIOU et A. ROQUES pour la fourniture du matériel biologique ayant permis la mise au point et la validation de cette méthode.

Le Laboratoire de la santé des végétaux remercie l'INRA de Sophia Antipolis pour l'expertise mobilisée lors de la revue de la présente méthode.

Des remerciements sont adressés aux agents du Laboratoire de la santé des Végétaux ayant participé à la correction du document.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

| Référence | Titre |
|--|---|
| Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 | Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté <i>Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022</i> |
| GLO 001 | Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV |
| REP001 | Répertoire des recettes MOA REP001 version 1b |
| | Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> sur extrait de bois. Septembre 2014 |
| | Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> dans des insectes vecteurs. Octobre 2014 |

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

FRANCOIS C., CASTAGNONE C., BOONHAM N., TOMLINSON J., LAWSON R., HOCKLAND S., QUILL J., VIEIRA P., MOTA M., CASTAGNONE-SERENO P. (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology* 8(6), 803-809.

IOOS R., FOURRIER C., IANCU G, GORDON TR. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.

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

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

Ce document est édité par :

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

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.