

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 005 version 5

Consultation

Détection du *banana bract mosaic potyvirus* (BBrMV) sur bananier par RT-PCR conventionnelle

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence « Virus sur bananier et plantes tropicales »

Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1a	Sans objet	Juin 2010	Version initiale
Version 2a	Majeure	Septembre 2010	La proportion entre matériel végétal frais et tampon d'extraction a été modifiée au paragraphe 7.2.2. car les proportions indiquées dans la version précédente étaient erronées. Cette modification fait suite aux remarques reçues dans le cadre de la consultation publique sur la version 1.
Version 3a	Majeure	Octobre 2012	Modification de la proportion entre matériel végétal frais et tampon d'extraction (§7.2.2). Différentes possibilités de durée d'incubation sont ajoutées pour apporter plus de flexibilité dans la réalisation des analyses.
Version 4	Mineure	Mars 2017	Mise au format Anses de la MOA 005 partie A Pas de modification sur le fond de la méthode. Ajout de la précision « PCR conventionnelle » au titre de la méthode et à chaque fois que la technique IC-RT-PCR est citée (notamment au § 9.2), afin de la distinguer de l'IC-RT-PCR temps réel. Ajout des §6.2, 7.2, 7.3 et 10. Modifications apportées sur le schéma de la méthode (§4) en reprenant uniquement ce qui relève de la présente méthode (suppression de la référence à la méthode de PCR temps réel). Des précisions / modifications sont apportées aux §8.2.2, §8.2.3 et §8.3.1.
Version 5*	Majeure	Avril 2025	Modifications apportées sur le schéma de détection de la méthode (§4) (remplacement de l'étape d'immunocapture par une extraction d'ARN). Suppression du paragraphe consacré à l'immunocapture et remplacement par un paragraphe consacré à l'extraction d'ARN (§8.3).

* La version 5 de cette méthode a fait l'objet d'une consultation du XXXX au XXXX, sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Ravageurs et agents pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection du *banana bract mosaic virus*.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT
3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode dans sa version actuelle ont donné lieu à un rapport de validation (rapport BBrMV_2024).

Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs	9
5.1 Eau	9
5.2 Réactifs de biologie moléculaire.....	9
5.3 Tampons	10
5.4 Autres réactifs et consommables	10
5.5 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	11
6.1 Broyeur	12
6.2 Thermocycleur	12
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	13
8 Mode opératoire	15
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	15
8.2 Broyage de l'échantillon	15
8.3 Extraction de l'ARN	16
8.4 RT-PCR conventionnelle : mélange réactionnel et amplification	16
9 Résultats.....	18
9.1 Contrôle de la validité des résultats	18
9.2 Calculs et expression des résultats	18
10 Caractéristiques de performance de la méthode	19
Annexe : Préparation du Tampon de broyage (General Extraction Buffer)	20
Bibliographie	21

Introduction

La mosaïque des bractées du bananier est une maladie des bananiers dont l'agent causal est le banana bract mosaic potyvirus (virus à ARN) ou BBrMV.

Les premiers stades de l'infection apparaissent sous la forme de tirets vert-jaune évoluant en nécroses brun-rouge sur le limbe et la nervure des feuilles. Ses lésions apparaissent en forme de fuseau sur le limbe des jeunes feuilles et parfois, elles apparaissent sur le pédoncule des régimes. Une mosaïque jaune ou des stries de décoloration blanchâtres se développent sur les pétioles et le pseudo-tronc selon les variétés atteintes. Au stade avancé de la maladie, une décoloration transitoire des feuilles est observée et évolue vers une nécrose rougeâtre. Lorsque les feuilles mortes sont arrachées, des taches ou des trainées brun sombre sont visibles sur le tissu interne. Des défauts de croissance sur les régimes et des fruits déformés sont également caractéristiques à des pertes dans le rendement et la qualité des fruits.

Les symptômes typiques de mosaïque sont présents sur les bractées (petites feuilles qui recouvrent les rangées de fleurs sur la tige), mais ne sont pas visible avant l'émergence de la fleur. Le BBrMV est transmis par différentes espèces de pucerons comme *Myzus persicae* et *Pentalonia nigronervosa* selon le mode non persistant. Il est également transmis à travers la diffusion de matériel infecté comme les rejets de bananier.



Figure 1 : Différents types de symptômes provoqués par le BBrMV (sur feuilles et pseudotracons)
(Sources: © M.-L. Iskra-Caruana, CIRAD ; © J. Thomas, QDPI&F ; © M.-L. Iskra-Caruana, CIRAD)

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement le virus responsable de la mosaïque des bractées du bananier. Elle est basée sur l'amplification génique des séquences spécifiques du BBrMV (Iskra-Caruana, Galzi, and Laboureau 2008)

Cette méthode est directement liée à la méthode d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette dernière.

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 nationale en vigueur.

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

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.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté doit être désinfecté.

1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode permet de détecter la présence du BBrMV sur bananier par la technique de reverse transcription-PCR (RT-PCR) conventionnelle à partir d'ARN extrait.

Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles ou bractées de bananiers, fraîches ou déshydratées, symptomatiques ou asymptomatiques.

2 Documents de référence

Tableau 2 : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

Référence	Titre
Rapport d'évaluation BBrMV_2009	Évaluation des différentes techniques de détection du Banana Bract Mosaic Virus (BBrMV) sur bananier
Rapport BBrMV octobre 2011	Rapport de validation complémentaire sur les modifications apportées à la version 2a
Rapport BBrMV 2024	Rapport de validation de la méthode de détection du banana bract mosaic virus (BBrMV) par RT-PCR

3 Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.

4 Principe de la méthode

La technique RT-PCR conventionnelle associe une extraction d'ARN et une amplification enzymatique des séquences spécifiques du BBrMV par PCR conventionnelle après une rétro-transcription.

Il s'agit d'une méthode qualitative, c'est à dire dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'organisme cible détecté dans une quantité d'échantillon donnée.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

La méthode peut être schématisée de la façon suivante :

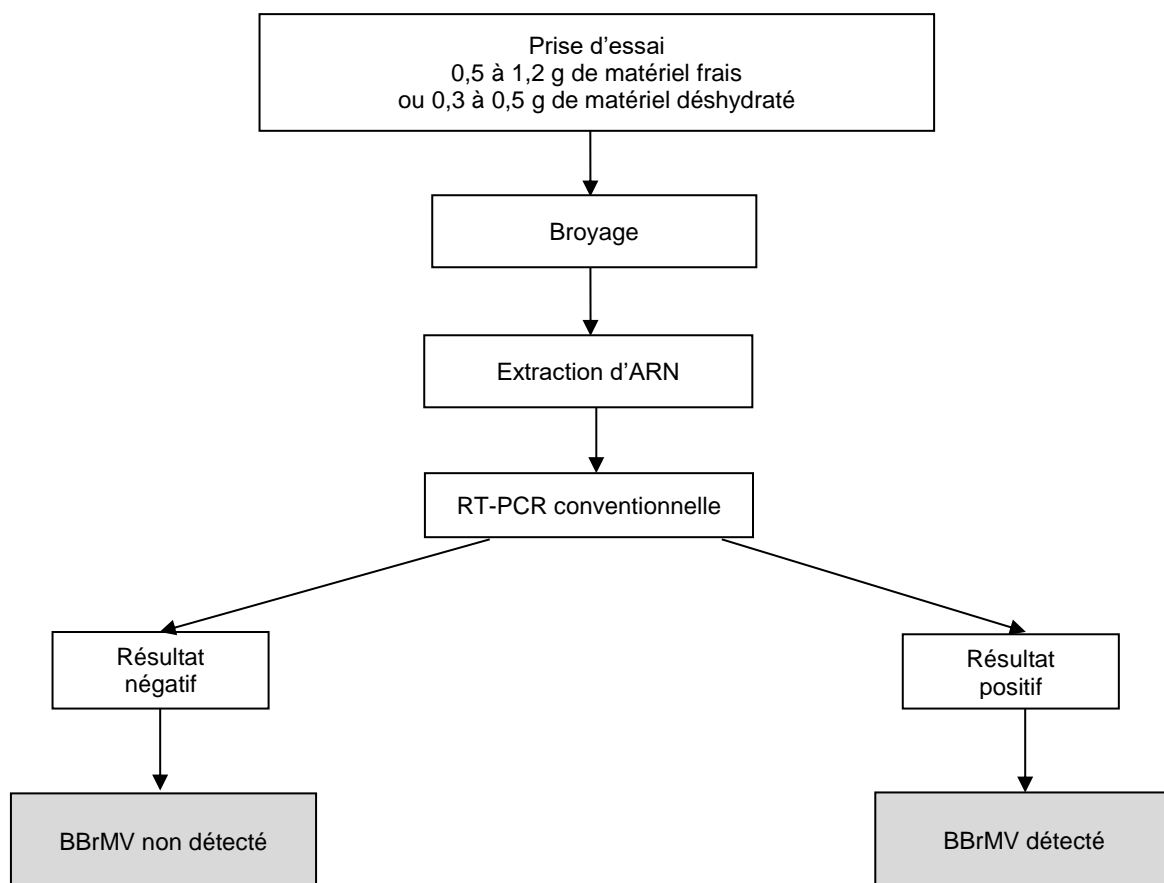


Figure 1 : Principe de la détection du BBrMV selon la MA 005.

5 Réactifs

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

En règle générale, l'utilisateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat (pour les tests de biologie moléculaire notamment : absence de nucléases, inhibiteurs de PCR, etc.). 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 juge satisfaisantes.

5.1 Eau

D'une manière générale l'eau utilisée pour la préparation des tampons doit être de qualité « analytique » garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR (préparation des mix, dilution des amplifiats) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure par exemple).

5.2 Réactifs de biologie moléculaire

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance des étapes d'extraction et d'amplification (kit d'extraction d'ARN, mastermix ou core kit commercial de polymérase thermostable et de transcriptase inverse, dNTP, amorces, sondes, eau de qualité de biologie moléculaire).

5.2.1 Kit d'extraction d'ARN

L'ARN total des prises d'essai est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN de plante disponible dans le commerce. La présente méthode a été caractérisée et validée à l'aide du kit est le RNeasy® plant mini kit de Qiagen.

5.2.2 Kit d'amplification de RT-PCR

La présente méthode a été caractérisée et validée à l'aide du kit OneStep RT-PCR de Qiagen. Le kit est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.2.3 Oligonucléotides

L'amplification spécifique de l'ADNc du BBrMV est réalisée grâce au couple d'amorces suivant :

Tableau 3 : Séquences des amorces.

Amorces	Séquence (5'-3')	Taille du fragment généré
BRAC T N2	ACA TGG AGT ATG GAT AAGG	260 pb
BRAC T NR :	GTG TGC YTC TCT AGC CCT GTT	

5.3 Tampons

5.3.1 Composition et préparation

La liste des tampons nécessaire à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- tampon de broyage type General Extraction Buffer (composition en annexe 1);
- tampons d'extraction d'ARN (par exemple : ceux du RNeasy® Plant mini kit de Qiagen)
- tampon de migration (par exemple, TBE ou TAE) ;
- tampon de charge

5.3.2 Conservation

Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il juge satisfaisantes pour atteindre les performances indiquées dans la méthode.

5.4 Autres réactifs et consommables

-Consommables à usage unique :

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de volume adapté
- Microtubes, barrettes ou plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé

- **Solution hydro-alcoolique à 70% ou plus** (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'isolement.

- **Produits de décontamination de type RNA Away ou équivalent** : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.

5.5 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, ces références sont constituées de :

- un contrôle positif de processus (T+) : idéalement il s'agit de matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser et déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (tissu de bananier infecté).
Ce contrôle donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation.
Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa spp.*) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur.
A noter toutefois que, dans le cas du BBMV, la disponibilité en matériel positif est problématique. Afin d'économiser du matériel positif, il est possible d'utiliser comme contrôle positif de processus un aliquot de 1mL de broyat d'échantillon végétal

contaminé par le BBrMV, possiblement dilué, issu d'un précédent broyage et qui aura été conservé congelé en solution mère.

Remarque : En l'absence d'échantillons végétaux contaminés par le BBrMV, l'étape d'extraction peut être validée par l'extraction d'une autre cible (par exemple un autre virus du bananier comme le CMV ou le BanMMV) réalisée au sein de la même série d'extraction et avec le même kit d'extraction. L'extraction est alors validée si le contrôle positif de processus pour l'autre cible (par exemple CMV) donne le résultat attendu dans le cadre de l'analyse dédiée (soit dans l'exemple donné : un résultat positif CMV suite à l'analyse de détection du CMV). Toutefois, pour l'analyse de détection du BBrMV, cela permet de ne valider que l'étape d'extraction. Pour valider aussi l'étape de RT-PCR BBrMV, il est nécessaire d'intégrer en plus un contrôle positif de RT-PCR (A+). Cf. ci-dessous.

- un contrôle positif de RT-PCR (A+) : il est constitué d'ARN cibles (extraits d'ARN issus d'un échantillon contaminé par du BBrMV) donnant un résultat positif BBrMV à l'issue de la RT-PCR. Ce contrôle est obligatoire uniquement lorsque le contrôle positif de processus (T+) est constitué d'une autre cible que le BBrMV.
- un contrôle négatif de processus (T-) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser et déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (tissu de bananier sain).
- un contrôle négatif de RT-PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ARN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de RT-PCR.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la MOA 022 (exemple : contrôles positif de RT-PCR, témoin en limite de détection). L'utilisation de ces références sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse ainsi que les résultats obtenus sur les différentes plaques. Leur observation et/ou lecture et conformité à l'attendu sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

6 Appareillage et matériels

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

Pour la mise en œuvre de cette méthode, et notamment des tests de biologie moléculaire, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode d'analyse MOA 022.

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 ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 4 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO8655 ou utiliser les EMT suivantes : volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (pour une température cible de $+5^{\circ}\text{C}$) Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Temps	EMT = 10%

**Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.*

6.1 Broyeur

La méthode a été validée en utilisant, pour la matrice végétale de type feuille ou bractées, un broyeur à roulement à billes (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Thermocycleur

La méthode a été évaluée sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cyclers de Applied Biosystems et sur thermocycleur VeritiPro™ Thermal Cyclers de Applied Biosystems. D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié : ni desséché, ni nécrosé, ni en cours de décomposition. Dans le cas contraire, le laboratoire émet des réserves sur l'acceptabilité de l'échantillon, en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état trop 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. Par ailleurs, la quantité de matériel végétal réceptionné doit être suffisante pour permettre la prise d'essai.

Si la quantité de matériel végétal reçue au laboratoire est insuffisante, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS (Bos, 1983)), la prise d'essai est constituée de 0,3g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,5g de matériel végétal déshydraté.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,2g de matériel végétal frais.

Le traitement individuel des échantillons doit être privilégié, notamment en présence d'échantillons asymptomatiques. Le regroupement par lot peut avoir des conséquences sur la sensibilité analytique de la méthode, ce mode d'analyse doit donc être choisi en connaissance de cause par le client. Il doit être mis en œuvre uniquement avec l'accord préalable, explicite et éclairé du demandeur d'analyse qui doit lui-même définir la conduite à tenir en cas de résultat positif sur le lot (par exemple, refaire une analyse individuelle).

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 5 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions, et de 3 à 4 semaines pour les échantillons déshydratés. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.

Si les échantillons ne peuvent être traités dans ce laps de temps, ils seront congelés à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de traitement (maximum 1 mois). Dans ce cas, la prise d'essai doit être effectuée, si possible, avant la congélation. D'autres modes de conservation peuvent être envisagés : la lyophilisation, la dessiccation par la méthode de BOS (dessiccation en présence de chlorure de calcium). Ces modes de conservation peuvent avoir une incidence sur la charge virale des échantillons avec la possibilité d'induire des résultats faussement négatifs (échantillons faiblement contaminés détectés négatifs). Lorsque le laboratoire est contraint d'utiliser du matériel lyophilisé ou en BOS, le rapport d'analyse doit mentionner cette particularité : « Echantillon traité après conservation » (citer le mode de conservation).

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat autre que négatif, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.

Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire ou une analyse de confirmation.

Tableau 5 : Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etape	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Matériel végétal frais	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
	Matériel végétal déshydraté	Dans un environnement sec (exemple: en boîte hermétique) à température ambiante, ou en conditions réfrigérées	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes/ pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat autre que négatif : 12 mois après envoi du rapport	
Broyage	Broyat végétal	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat autre que négatif : 12 mois après envoi du rapport	
Extraction d'ARN	Extraits d'ARN	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante ou conditions réfrigérées (froid positif ou négatif) Transporteur rapide
			Résultat autre que négatif : 12 mois après envoi du rapport	

8 Mode opératoire

L'ensemble des opérations décrites ci-après doit s'effectuer en portant des gants à usage unique.

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés.

1) Le traitement individuel des échantillons.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g et au maximum de 1,2g de matériel végétal.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,3g et au maximum de 0,5g de matériel végétal.

2) Cas du regroupement par lot.

En cas de regroupement d'échantillons (au maximum 5), il est nécessaire d'adapter les pesées individuelles de façon à ce que la pesée globale soit comprise dans l'intervalle préconisé pour le traitement individuel des échantillons.

Par exemple pour un regroupement de 2 échantillons frais : peser au minimum 0,25g par échantillon ($2 \times 0,25 = 0,5g$ ce qui correspond à la borne inférieure pour le traitement en individuel) et au maximum 0,6g par échantillon ($2 \times 0,6g = 1,2g$ ce qui correspond à la borne supérieure pour le traitement en individuel).

Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

8.2 Broyage de l'échantillon

Ajouter le tampon de broyage pour obtenir une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de l'échantillon considéré frais selon les recommandations suivantes :

Tableau 6: Volume de tampon à ajouter selon le type d'échantillons et la masse du mélange

Type d'échantillon	Nature d'échantillon	Masse de la prise d'essai	Volume de tampon à ajouter
Déshydraté	Feuilles	0,5 g	12,5 mL
		0,3 g	7,5 mL
	Bractées	0,5 g	21,0 mL
		0,3 g	12,6 mL
Frais	Feuilles ou bractées	1,2 g	10,8 mL
		0,5 g	4,5 mL

Broyer jusqu'à obtention d'un mélange homogène à l'aide d'un broyeur à billes.

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus vite possible (au plus tard dans la journée).

Transférer 1mL de broyat dans des tubes de type Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation. Les tubes sont ensuite centrifugés à grande vitesse (à titre d'exemple 15 minutes à 20 000g) afin de culoter les particules virales (l'utilisation d'une centrifugeuse réfrigérée est recommandée). Retirer le surnageant. Ce culot peut soit être conservé à +5°C (pendant quelques heures), soit être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C (pendant quelques jours), en attente de l'extraction ou être directement extrait.

A partir de cette étape, on peut commencer l'extraction de l'ARN.

8.3 Extraction de l'ARN

Chaque échantillon fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être amplifié deux fois soit au final 2 puits par échantillon (analyse de détection).

L'ARN viral est extrait et purifié en suivant le protocole d'extraction (Quick-start Protocol : RNeasy Plant mini kit), en commençant par l'étape 2, décrite dans le manuel: « Ajouter dans chaque tube 450uL de RLT. Vortexer jusqu'à la suspension totale du culot ». Puis continuer les différentes étapes décrites.

L'élution de l'ARN total se fait dans 100µl (à titre indicatif 2 x 50µl).

Les extraits d'ARN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température inférieure ou égale à -18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.

8.4 RT-PCR conventionnelle : mélange réactionnel et amplification

8.4.1 Mélange réactionnel et amplification

Remarque : Pendant toute la préparation de la réaction, le port des gants est obligatoire et l'ensemble des réactifs doit être maintenu au froid (glace ou utilisation de portoirs réfrigérés) pour limiter la dégradation des ARNs.

Constituer le mélange réactionnel suivant pour un volume total de 25 µL.

Tableau 7 : Mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif (pour un volume total de 25 µL par microtube)	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en µL)
Eau ultra pure			14,5
Tampon	1X	5X	5,0
dNTP	0,2 mM	10 mM	0,5
Amorce Bract NR	0,40 µM	10 µM	1,0
Amorce Bract N2	0,40 µM	10 µM	1,0
RT/Taq mix			1,0

Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 23µl de mélange réactionnel et 2µl d'ARN ou d'eau.

Dans la mesure du possible, effectuer une petite centrifugation afin de « fixer » le mélange réactionnel au fond des puits.

Programmer le thermocycleur de la manière suivante :

Tableau 8 : Programme d'amplification.

Température (°C)		Durée	Cycles
Reverse transcription	50	30 min	
Activation Hot Start - Dégradation reverse transcriptase	94	15 min	
Dénaturation	94	1 min	30
Hybridation	57	1 min	
Elongation	72	30 sec	
Elongation finale	72	5 min	
Conservation	12	∞	

8.4.2 Electrophorèse et révélation

Déposer environ 10µL de l'amplifiât mélangé à du bleu de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives).

Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus (260 pb), doit être déposée sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Effectuer l'électrophorèse (à titre indicatif, 100 volts durant 1h) dans du tampon de migration à concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel.

Une fois l'électrophorèse finie, colorer le gel dans un bain de bromure d'éthidium (BET) ou tout autre intercalant ADN équivalent, et révéler sous UV. Le BET est très fréquemment utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL. Cette solution doit être protégée de la lumière. Après coloration, rincer le gel à l'eau (sans chlore).

Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel et d'utiliser une impression papier ou le fichier informatique pour analyser les résultats.

D'autres marqueurs d'ADN équivalents au BET peuvent également être utilisés.

***Remarque** : Veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau). Veiller également à la protection des utilisateurs lors de la manipulation du BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.*

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

L'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Tableau 9 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés.

Type de contrôle	Résultat attendu
Contrôle négatif de processus (T -)	NEGATIF
Contrôle négatif de RT-PCR (A -)	NEGATIF
Contrôle positif de processus (T +)	POSITIF
Contrôle positif de RT-PCR (A +)*	POSITIF

*Contrôle optionnel sauf lorsque le T+ est constitué d'une autre cible que le BBrMV.

9.2 Calculs et expression des résultats

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue (260 pb).

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 10 : Interprétation des résultats des échantillons.

Analyse		Résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NEGATIF

Expression des résultats

Résultat Positif : Banana bract mosaic virus détecté

Résultat Négatif : Banana bract mosaic virus non détecté

Reliquats d'échantillons: cf. §7.3.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LSV sous la référence BBrMV_2024.

Tableau 11 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection la du BBrMV par RT-PCR conventionnelle

Caractéristique	Paramètre	Résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	100%	4 échantillons cibles * 4 réplicats
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	100%	7 échantillons non-cibles 4 réplicats
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	100%	4 échantillons cibles * 4 réplicats + 7 échantillons non-cibles 4 réplicats
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel 99% des résultats sont positifs	1/100	4 gammes avec 7 niveaux de dilution (1/10 ; 1/20 ; 1/50 ; 1/100 ; 1/1000 ; 1/10 000 ; 1/100 000) selon les modalités de l'annexe D du rapport de validation BBrMV_2024.
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	100%	Les résultats obtenus pour la caractérisation du seuil de détection sont repris pour évaluer la répétabilité.
Reproductibilité	Pourcentage d'accords entre réplicats pour les mêmes échantillons	91%**	2 échantillons cibles dont une gamme avec 7 niveaux de dilutions (1/10 ; 1/20 ; 1/50 ; 1/100 ; 1/1000 ; 1/10 000 ; 1/100 000) et 2 échantillons non cibles, selon les modalités de l'annexe F du rapport de validation BBrMV_2024.

* Nombre de cible limité car peu de matériel cible disponible

** Reproductibilité égale à 91% car une discordance sur un seul échantillon cible, celui dilué au 1/1 000.

Annexe : Préparation du Tampon de broyage (General Extraction Buffer)

Nom du produit	Quantité pour 1 L de solution
Sodium sulfite anhydre	1,3 g
Ovalbumine	2g
PVP	20g
Tween 20	20,5g
PBS 10X	100mL
H2O distillée stérile	900mL

Ajuster le pH à = 7,4.

Bibliographie

Bos, L. 1983. "Order out of chaos: Preservation in BOS." In *Introduction to plant virology*, 160. Wageningen, Netherlands.

Iskra-Caruana, M. L., S. Galzi, and N. Laboureau. 2008. "A reliable IC One-step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of Musa germplasm." *J Virol Methods* 153 (2):223-31. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.06.028.

MOA 022 - Méthode officielle d'analyse « 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 »