Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA002- Version 3

Septembre 2026

Détection de *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* et *Lecanosticta acicola* par PCR en temps réel quadruplex

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence " tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023"

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
v1a		mars 2010	Version initiale
v1b	Mineures	mai 2014	Passage de l'analyse en *triplicata* à l'analyse en *duplicata* des extraits d'ADN
V2 *	Mineures	2017	• Changement de format de présentation de la méthode • Mise à jour des règles de décision et de leur présentation Changement du seuil de positivité d'un réplicat de PCR pour la cible
v3**	Majeures	2026	Règles de positivité d'un échantillon Amélioration du texte pour apporter plus de clarté

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 20/09/2017 au 05/11/2017 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

** La version 3 a fait l'objet d'une consultation du 16/06/2026 au 17/07/2026 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

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

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) et l'UMR 1136 de l'INRA de Champenoux visant à mettre au point une technique moléculaire de détection des champignons *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* et *Lecanosticta acicola* (Ioos *et al.*, 2010).

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV et a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Sommaire

Introduction **5**

Avertissements et précautions de sécurité **5**

1. Objet et domaine d'application **6**

2. Documents de référence **6**

3. Termes, sigles et définitions **7**

4. Principe de la méthode **7**

5. Réactifs **8**

5.1 Eau 8

5.2 Kits d'extraction d'ADN 8

5.3 Oligonucléotides 8

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel 9

5.5 Autres consommables à usage unique 9

5.6 Contrôles et témoins 9

6. Appareillage et matériels **11**

7. Échantillons **12**

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons 12

7.2 Conservation des échantillons avant analyse 13

7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés : 13

8. Mode opératoire **13**

8.1 Préparation des échantillons pour analyse 13

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total 14

8.3 Test de détection par PCR en temps réel 15

9. Résultats **17**

9.1 Contrôle de la validité des résultats 17

9.2 Calculs et expression des résultats 17

10. Caractéristiques de performance de la méthode **19**

Bibliographie **26**

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Introduction

Lecanosticta acicola (Thümen) H. Sydow, *Dothistroma pini* et *Dothistroma septosporum* sont des champignons phytopathogènes causant des maladies des aiguilles sur les conifères. *Lecanosticta acicola* (anciennement nommé *Mycosphaerella dearnessii*) est l'agent des taches brunes des aiguilles. *Dothistroma pini* et *Dothistroma septosporum* (anciennement regroupés sous le terme *Mycosphaerella pini,* Barnes *et al.* (2004)) sont les agents responsables de la maladie des bandes rouges des aiguilles. Il est à noter que des cas de co-infection d'un même échantillon pour analyse par deux des trois parasites sont décrits dans la littérature.

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 exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène doit être en accord avec la règlementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés pendant la phase d'extraction - purification d'ADN total peuvent être éliminés sans traitement particulier (plus de parasite viable à ce stade).

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mélange réactionnel et chargement des solutions d'ADN peuvent être éliminés sans traitement particulier.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

1. Objet et domaine d'application

La méthode repose sur l'emploi de la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et de sondes marquées, respectivement spécifiques de *L. acicola*, de *D. septosporum* et de *D. pini* permet de détecter et d'amplifier une région discriminante de l'ADN génomique pour chacun de ces champignons. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de tissus d'aiguilles broyés.

L'utilisation en quadruplex real-time PCR d'une autre combinaison de sonde et d'amorce (18S uni-F/-R/-P) permet d'évaluer simultanément la qualité des extraits d'ADN testés.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *L. acicola*, *D. septosporum* et *D. pini* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de l'une ou de plusieurs de ces espèces ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode concerne les aiguilles de *Pinus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* et *Picea abies*. La méthode présentée est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'import ou à l'export de végétaux. Néanmoins, selon l'évolution des connaissances scientifiques concernant ce parasite, cette méthode reste utilisable sur d'autres plantes si la gamme d'hôtes potentiels ou avérés venait à s'élargir. Les paramètres de validation de l'analyse seraient toutefois à adapter (p.ex. Ct seuil 18S).

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des aiguilles de *Pinus nigra* présentant des symptômes. Elle est toutefois utilisable sur les aiguilles des autres essences hôtes citées plus haut. Les échantillons pour analyse peuvent être constitués d'aiguilles seules ou encore attachées à leur rameau.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : Sans objet.

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 des organismes phytopathogènes

[2] **MOA GLO 001** : glossaire général et technique en vigueur au LNPV.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

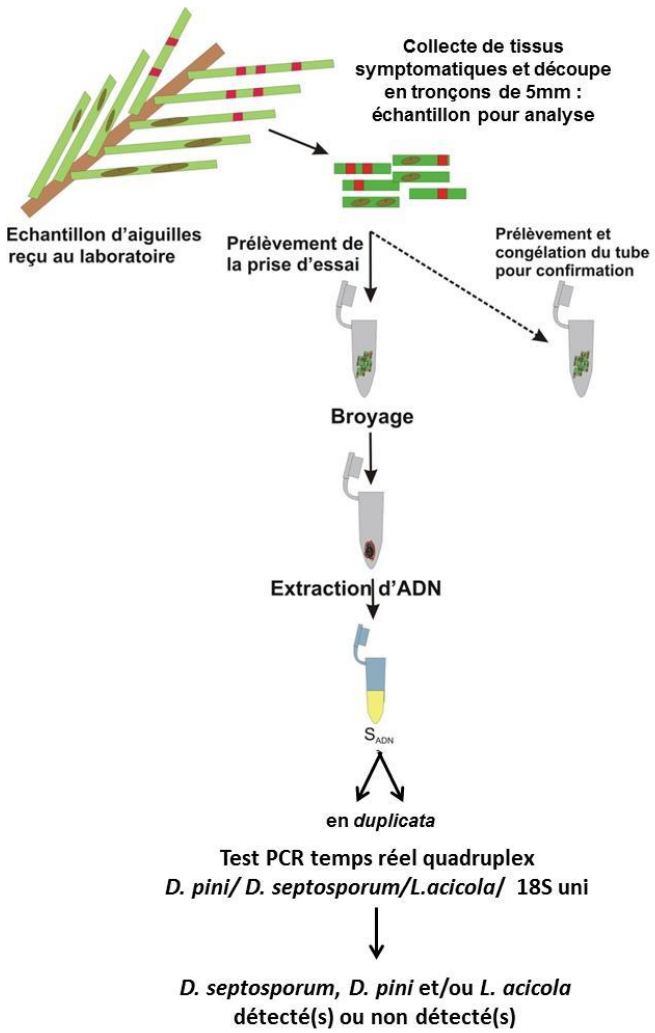
3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse 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 de la méthode d'analyse.

4. Principe de la méthode

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



© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

5. Réactifs

<u>Avertissement</u> : 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. Les résultats originaux de validation sont disponibles dans le dossier de validation MOA002 du LNR – LSV unité de mycologie.

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

5.1 Eau

L'eau utilisée comme réactif doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit initialement validé pour cette méthode est le PureLink Plant Total DNA purification kit (Invitrogen) (Ioos et al. 2010, dossier LNR de validation de la méthode MOA002). Le kit DNeasy plant mini kit (Qiagen) a aussi été validé (dossier LNR de validation de la méthode MOA002).

5.3 Oligonucléotides

Tableau 1 : séquences des amorces et sondes utilisées dans cette méthode

Cible	Test	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
L. acicola	MDtef	MDtef-F1[a]	CCTCCTTCATCTTCCCCTTC
		MDtef-R1[a]	TGTGGGAGATAGCGTTGTCA
		MDtef-P1[a]	Cy5-CAAGCACTCTTGGAACACACCGC-BHQ3/2
D. pini	DPtef	DPtef-F1[a]	ACAGCAATCACACCCTTGC
		DPtef-R1[a]	TCATGTGCTCAATGTGAGATGT

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

		DPtef-P1[a]	FAM-CCCCAGCCGATTACACGACG-BHQ1
D. septosporum	DStub	DStub2-F1[a]	CGAACATGGACTGAGCAAAA
		DStub2-R1[a]	TGCCTTCGTATCTGCATTTC
		DStub2-P1[a]	ROX-TGGAATCCACAGACGCGTCA-BHQ2
Plante/champignon	18S uni	18S uni-F[b]	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
		18S uni-R[b]	CCACCACCCATAGAATCAAGA
		18S uni-P[b]	JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1

[a] (Ioos *et al*., 2010)

[b] (Ioos *et al.*, 2009)

Les amorces et sondes initialement validées pour cette méthode ont été synthétisées par Eurogentec. D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel

Le kit initialement validé pour cette méthode est le qPCR core kit No ROX (Eurogentec) (Ioos *et al*. 2010, dossier LNR de validation de la méthode MOA002). Le kit QuantiTect Multiplex PCR NoROX kit (Qiagen) ainsi que le kit Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP (Eurogentec) ont été également validés (dossier LNR de validation de la méthode MOA002).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Pointes à filtre stériles de volume adapté
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Billes de broyage stériles en acier ou en carbure de tungstène de 3 mm de diamètre ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des cultures fongiques.

5.6 Contrôles et témoins

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

i) l'opérateur a correctement suivi le protocole,

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

ii) les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,

iii) les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration des solutions utilisées étaient corrects,

iv) l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),

v) il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteurs sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (Ioos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour un des parasites cibles ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection simultané des trois parasites (quadruplex). En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (aiguilles de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions.

  Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 18.8 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA002).

- **Un témoin négatif d'extraction ($T\text{-}_{extr}$) ou un témoin négatif de processus ($T\text{-}_{PROC}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (=$T\text{-}_{extr}$), c'est-à-dire un microtube de 2 ml stérile vide , subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de $T\text{-}_{extr}$ doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts. Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon d'aiguilles de *Pinus* reconnu non contaminé par aucun des trois parasites cibles (témoin négatif de processus, $T\text{-}_{PROC}$).

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

- **Un témoin positif d'amplification plante (T+ $_{18S\ Pinus}$)** sera systématiquement testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S Uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 1 ng/µL obtenue à partir d'un échantillon de platane.

- **Un témoin positif d'amplification en limite pratique de détection** (**T+$_{LOD}$**) correspondant à chacun des parasites cibles sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique, volumétrique, et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de chacun des 3 parasites cibles puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ces T+$_{LOD}$ sont chacun constitués d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de l'organisme cible ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR spécifique. Ces T+$_{LOD}$ doivent être caractérisés par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T+$_{LOD}$ peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.

  Dans les conditions de validation du LNR, les limites de détection des tests ont été estimées à 24,2 copies plasmidiques de cible pour le test DPtef, 2,4 c.p. pour DStub et 2,4 c.p. pour MDtef par tube de PCR.

- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S$_{ADN}$** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

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

6. Appareillage et matériels

<u>Avertissement</u> : 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.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 022 ou de la norme ISO 8655 (versions en vigueur).

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

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des fluorophores de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research/Qiagen.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu oscillant (de « beadbeater ») avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).
- Centrifugeuse de paillasse équipée d'un rotor pouvant recevoir des microtubes de 1,5 et 2 mL

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse :

Les échantillons sont constitués d'au moins un rameau feuillé présentant des symptômes (cf. Annexe 1). 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.

Confection du colis :

Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique (tube ou sachet plastique épais) 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.

Fiche de demande d'analyse :

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Formulation claire de la demande, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 30 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C±3°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché (cf. Annexe 2). Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La prise d'essai s'effectuera sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *L. acicola* (jaunissement d'aiguille + taches brunes), *D. pini ou D. septosporum* (jaunissement d'aiguilles + bandes rouges pour les deux espèces) ou éventuellement des symptômes douteux.

Les prélèvements s'effectuent sur des aiguilles où des tronçons d'environ 5 mm ciblant les régions les plus pertinentes seront découpés à l'aide d'un scalpel stérile. Transférer au maximum 15 tronçons d'aiguilles dans un microtube stérile de 2 ml (moins si on ne dispose pas de suffisamment de portions d'aiguilles avec des symptômes typiques). Ceci constituera la prise d'essai.

En cas d'absence de symptômes typiques bien visibles, prélever alors des tronçons d'aiguilles dans des parties jaunissantes, en conservant lorsque c'est possible une marge de tissu vert.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

A cette étape, et lorsque la quantité d'aiguilles symptomatiques le permet, il est recommandé de préparer un tube supplémentaire de fragments, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total

Le tube faisant office de témoin négatif d'extraction ($T\text{-}_{extr}$) sera ouvert en premier et refermé en dernier, cela à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.

1. Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai, centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.

2. Prélever deux billes de broyage, ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer deux billes de broyage stériles.

3. Ajouter dans chaque microtube de prise d'essai le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN, fournie avec le kit d'extraction. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.

4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz, soit 1800 coups par minute. Pendant la phase de broyage, arrêter à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.

5. Centrifuger les microtubes quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.

6. Incuber les microtubes pendant la durée et à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN. Pendant l'incubation, vortexer chaque microtube à au moins une reprise pour homogénéiser son contenu qui aura tendance à sédimenter.

7. A la fin de l'incubation centrifuger les microtubes environ 5 min à une accélération supérieure ou égale à 20.000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.

8. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.

9. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total issu de chaque prise d'essai est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'élution. Ces solutions constitueront la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection *D. pini*, *D. septosporum et L. acicola* (Test quadruplex DPtef, DStub, MDtef et 18S uni)

Le volume réactionnel est 20 µl : 18 µl du mélange réactionnel et 2 µl de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1X
Amorce MDtef-F1	0.3 µM
Amorce MDtef-R1	0.3 µM
Sonde MDtef-P1	0.1 µM
Amorce DPtef-F1	0.3 µM
Amorce DPtef-R1	0.3 µM
Sonde DPtef-P1	0.1 µM
Amorce DStub-F1	0.3 µM
Amorce DStub-R1	0.3 µM
Sonde DStub-P1	0.1 µM
Amorce 18S uni-F	0.3 µM
Amorce 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL.
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de pointes à filtres stériles.
4. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µL par microtube.

Ajout des solutions d'ADN à tester dans les microtubes de PCR

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en deux réplicats (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µL par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'une pointe à filtre stérile.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en deux réplicats : $T-_{extr}$, $T+_{LOD}$, etc. Pour le T- (NTC), on substitue à la S_{ADN} 2 µL d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection multiplexe des agents pathogènes sont les suivants :

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN*	95°C	3 min	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation – polymérisation	60°C	55 sec puis mesure de la fluorescence FAM, JOE, ROX et Cy5	

*à adapter selon les recommandations du fournisseur de la polymérase ADN

A la fin de l'amplification par polymérisation en chaîne, les tubes de PCR sont évacués et détruits.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

9. Résultats

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.

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

a) Aucun des réplicats de $T\text{-}_{extr}$ n'a généré de valeur de Ct pour le test cible => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.

b) Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de valeur de Ct pour le test cible => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.

c) Les réplicats de $T+_{LOD}$ ont chacun généré une valeur de Ct pour le test cible => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *D pini, D septosporum et L. acicola*.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou une partie de l'analyse est à refaire.

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN}, donc des prises d'essai et de leur deux réplicats testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour établir le statut d'un échantillon (positif, négatif ou indéterminé), relever le Ct moyen du contrôle $T+_{LOD}$ ($Ctmoy_{LOD}$) puis pour chacun des tests et chacune des prises d'essais, relever le Ct de chaque réplicat :

- Un réplicat d'un extrait d'ADN testé dont le Ct est inférieur ou égal au $Ctmoy_{LOD}$ est considéré comme positif pour le test cible.
- Un réplicat d'un extrait d'ADN testé dont le Ct généré est inférieur ou égal à la valeur de Ct 18S Uni maximale déterminée expérimentalement par le laboratoire est considéré comme positif pour le test 18S Uni.

L'analyse des résultats pour une prise d'essai, ainsi que les règles de décision applicables sont présentées ci-dessous dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : PCR multiplexe cible/18S Uni réalisées sur S_{ADN}

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Test cible		Test 18S Uni		Décision et résultat
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	+	*n.a.	n.a.	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène détecté (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola*)**
-	-	+	+	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola*)**
-	-	-	-	Refaire la PCR multiplex sur **S_{ADN} diluée 10 fois** et suivre le tableau 2 pour les règles décisionnelles sauf si une des deux autres cibles est détectée
+	-	+	-	Refaire la PCR multiplexe, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR cible en triplicat. A l'issue de ce test, si ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène détecté (*D. pini et/ou D septosporum et/ou Lecanosticta acicola*)** ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*D. pini et/ou D septosporum et/ou Lecanosticta acicola*)**

***n.a. : les données ne sont pas à analyser**

[1] Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou en une analyse par séquençage de l'amplicon obtenu.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Tableau 2 : PCR multiplexe cibles/18S Uni réalisée sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test cible		Test 18S Uni		Décision et résultat
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat	Réplicat 2	
+	**+**	***n.a.**	**n.a.**	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola)***
-	**-**	**+**	**+**	**Arrêt de l'analyse : agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola)***
-	**-**	**-**	**-**	Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai. **Sinon, arrêt de l'analyse : résultat indéterminé**[1] sauf si une des deux autres cibles est détectée
+	**-**	**+**	**-**	Refaire la PCR multiplexe, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	**-**	**+**	**+**	Refaire uniquement la PCR cible et en triplicat. A l'issue de ce test, si ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène détecté (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola)*** ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => **agent pathogène non détecté au seuil de détection de la méthode (*D. pini* et/ou *D septosporum* et/ou *Lecanosticta acicola)***

***n.a. : les données ne sont pas à analyser**

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MOA002.

Pour l'évaluation des critères de performance, le qPCR core kit no ROX (Eurogentec) ainsi que le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen) ont été utilisés. Les différentes valeurs obtenues sont présentées pour chaque kit utilisé.

Critère de performance	Résultats obtenus

[1] Si possible, doser la quantité d'ADN afin de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	• L'efficacité de la réaction quadruplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de *Pinus nigra* a été évaluée à 0,99 pour *D. pini*, à 1.02 pour *D. septosporum* et 1.03 pour *L. acicola* en utilisant le qPCR core kit no ROX (Eurogentec). • L'efficacité de la réaction quadruplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de *Pinus nigra* a été évaluée à 1.01 pour *D. pini*, à 0.92 pour *D. septosporum* et 0.96 *L. acicola* en utilisant le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen). • Le R^2 calculé pour les deux kits PCR et pour les trois cibles est de 0,99.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 484,48, 48 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR respectivement pour *D. pini, D. septosporum et L. acicola* (soit 24.2 et 2,4 et 2.4 cp/µL) pour une réaction quadruplex avec dilution dans du TE (1x) en utilisant le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).
Spécificité analytique	La spécificité analytique a été évaluée sur une gamme appropriée de différentes espèces génétiquement proches des cibles (11 isolats représentant 2 espèces pour *D. pini*, 12 isolats représentant 2 espèces pour *D. septosporum*, 11 isolats représentant 2 espèces pour *L. acicola*) et d'espèces de champignons qui partagent le même genre de plante hôte (19 espèces, 19 isolats) et en utilisant qPCR core kit no ROX (Eurogentec) et le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen). Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique pour les deux kits de PCR en temps réel utilisés.
Inclusivité	L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée in silico par blast sur la base de données GenBank et in vitro sur une gamme d'isolats de *D. pini* (6 isolats), de *D. septosporum* (5 isolats) et de *L. acicola* (6 isolats) de différentes provenances géographiques, en utilisant qPCR core kit no ROX (Eurogentec) et le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen). Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif pour les deux kits de PCR en temps réel utilisés.
Répétabilité et reproductibilité	La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'ADN génomique extraits à partir de cultures fongiques calibrées dosés à 4 concentrations proches de la limite de détection et dilués dans de l'ADN de *Pinus nigra*, et sur un échantillon de pin naturellement

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

contaminé par l'une des trois cibles, en utilisant le qPCR core kit no ROX (Eurogentec)

Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Cible *D.pini :*

Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif	
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
ADN génomique	2000	0.2	0.1	+	+
	200	0.6	1.1	+	+
	20	0.9	1.0	+	+
	2 (LOD)	1.2	1.1	+	+
Echantillon	nd	0.5	0.6	+	+

Cible *D. septosporum :*

Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif	
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
ADN génomique	2000	0.7	0.3	+	+
	200	0.6	0.5	+	+
	20	1.0	1.4	+	+
	2 (LOD)	1.1	1.5	+	+
Echantillon	nd	1.0	1.3	+	+

Cible *L. acicola :*

Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif	
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
ADN génomique	2000	0.4	0.6	+	+
	200	0.7	1.0	+	+
	20	1.1	1.5	+	+
	2 (LOD)	1.3	1.7	+	+
Echantillon	nd	0.9	1.4	+	+

Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

<table>
<tr><td></td><td>Le test quadruplex est donc répétable et reproductible.</td></tr>
<tr><td>Autres critères :
Validation d'un nouveau kit de PCR en temps réel</td><td>Suite à l'arrêt de fabrication du kit « qPCR Corekit No ROX » (Eurogentec) initialement validé, le kit « Takyon No Rox Probe Core Kit dTTP » (Eurogentec) a été validé.

Les paramètres qui ont été testés sont : la sensibilité analytique, l'inclusivité, la spécificité analytique, la répétabilité, la sensibilité et la spécificité relative ainsi que la comparaison des Ct 18S-Uni.

<table>
<tr><th colspan="4">Validation des nouveaux critères de performance</th></tr>
<tr><th>Paramètre</th><th>Valeur obtenue</th><th>Valeur attendue</th><th></th></tr>
<tr><td>Sensibilité analytique</td><td>Dp : 10/10 T+LOD génèrent un Ct.
Ds : 10/10 T+LOD génèrent un Ct.
La : 10/10 T+LOD génèrent un Ct.</td><td>10/10 T+LOD génèrent un Ct pour chaque cible.</td><td></td></tr>
<tr><td>Inclusivité</td><td>Dp : les 3 souches Dothistroma pini génèrent un Ct correct.
Ds : les 3 souches Dothistroma septosporum génèrent un Ct correct.
La : les 9 souches Lecanosticta acicola génèrent un Ct correct.</td><td>Les souches cibles génèrent un Ct pour chaque cible.</td><td></td></tr>
<tr><td>Spécificité analytique</td><td>Dp : les 11 souches génétiquement proches de Dothistroma pini ne génèrent pas de Ct.
Ds : les 11 souches génétiquement proches de Dothistroma septosporum ne génèrent pas de Ct.
La : les 6 souches génétiquement proches de Lecanosticta acicola ne génèrent pas de Ct.</td><td>Les souches non cibles ne génèrent pas de Ct.</td><td></td></tr>
<tr><td>Répétabilité</td><td>10/10 T+cal génèrent un Ct = 23,10 ± 0,18.</td><td>10/10 T+cal génèrent un Ct ≈23.</td><td></td></tr>
</table>
</td></tr>
</table>

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

	Sensibilité / Spécificité relative	Dp : les 3 échantillons positifs génèrent un Ct ≈ Ct générés avec l'ancien Core Kit. Les échantillons négatifs ne génèrent pas de Ct. Ds : les 3 échantillons positifs génèrent un Ct ≈ Ct générés avec l'ancien Core Kit. Les échantillons négatifs ne génèrent pas de Ct. La : les 3 échantillons positifs génèrent un Ct ≈ Ct générés avec l'ancien Core Kit. Les échantillons négatifs ne génèrent pas de Ct.	Les échantillons positifs doivent générer un Ct ≈ Ct générés avec l'ancien Core Kit. Les échantillons négatifs ne génèrent pas de CT.		Conforme
	Comparaison CT 18S-Uni	Les Ct générés avec le test 18S-Uni sur des échantillons positifs et négatifs génèrent des CT≈ aux Ct18S-Uni générés avec l'ancien Core Kit	Les Ct générés avec le test 18S-Uni sur des échantillons doivent être inférieur au Ct seuil.		Conforme
	Tous ces paramètres sont conformes et donnent des valeurs équivalentes à celles générées par le kit qPCR Corekit No ROX (Eurogentec) QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).				

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Annexe 1 : Symptômes de la maladie des bandes rouges et des taches brunes

Figure 1

Fig. 1 : Maladie des bandes rouges. Au printemps, les taches se développent en encerclant l'aiguille pour former des bandes brun-rougeâtre caractéristiques. Ces dernières sont essentiellement localisées au niveau de l'apex et de la partie médiane de l'aiguille. *(Photo ANSES-LSV)*

Figure 2

Fig. 2 : Maladie des bandes rouges. Un autre symptôme caractéristique correspond au dessèchement de la zone apicale des aiguilles tandis que la base reste verte. Les bandes rougeâtres ne sont pas toujours bien visibles et les aiguilles peuvent présenter un brunissement général. Ces symptômes peuvent être confondus avec ceux causés par *Lecanosticta acicola* ou d'autres agents pathogènes des aiguilles de pins. *(Photo ANSES-LSV)*

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Figure 3

Fig. 3 : Maladie des taches brunes. Apparition sur aiguilles âgées de nombreuses petites taches jaunâtres devenant brunes et souvent délimitées par une bordure plus foncée. Un halo jaune est également souvent visible autour de la tache. *(Photo ANSES-LSV)*

Figure 4

Fig. 4 : Maladie des taches brunes. Les aiguilles affectées présentent souvent trois zones distinctes caractéristiques : une base restant verte, une partie médiane ponctuée de taches pouvant devenir coalescentes et une extrémité desséchée. A terme, les aiguilles sèchent et tombent à l'automne. Seules les aiguilles de l'année restent saines. *(Photo ANSES-LSV)*

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-

Bibliographie

Barnes I, Crous PW, Wingfield BD & Wingfield MJ (2004) Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology* **50**, 551-565.

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.

Ioos R, Fabre B, Saurat C, Fourrier C, Frey P & Marçais B (2010) Development, Comparison, and Validation of Real-Time and Conventional PCR Tools for the Detection of the Fungal Pathogens Causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of Pine. *Phytopathology* **100**, 105-114.

© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex