Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 038 - Version 1

Consultation

Détection de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (*Xea*) sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence « Bactéries sur bananier, agrumes et plantes tropicales »

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

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 1*	Sans objet	XXXXX	Version initiale

* La version 1 de cette méthode a fait l'objet d'une consultation de XXX à XXX 2026, sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

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

Avant-propos

La méthode décrite dans ce document s'appuie sur le protocole de diagnostic de l'OEPP PM7/128 (1) concernant la détection de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* (anc. *Xanthomonas axonopodis pv. allii).*

Elle s'appuie également, pour les tests de biologie moléculaire (duplex nested-PCR conventionnelle et triplex PCR temps réel), sur les publications scientifiques de Robène-Soustrade *et al.* (6) et Robène *et al.* (7).

La présente 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 des bactéries sur plantes tropicales.

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 ont donné lieu à un rapport de validation (RF-PJ/XEA01-V1-FR, juillet 2015).

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité Bactériologie, Virologie et détection des OGM du Laboratoire de la Santé des Végétaux ainsi que par le CIRAD Réunion (UMR PVBMT).

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

Sommaire

Avant-propos 3

Avertissements et précautions de sécurité 5

1 Objet et domaine d'application 6

2 Documents de référence 7

3 Termes, sigles et définitions 7

4 Principe de la méthode 8

5 Réactifs 11
5.1 Eau 11
5.2 Réactifs de biologie moléculaire 11
5.3 Tampons 13
5.4 Milieux de culture 13
5.5 Autres réactifs et consommables 14
5.6 Contrôles et témoins 14

6 Appareillage et matériels 16
6.1 Broyeur / homogénéisateur 17
6.2 Thermocycleur 17
6.3 Appareillage et matériels pour le test d'isolement 18

7 Échantillons 18
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons 18
7.2 Conservation des échantillons avant analyse 19
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse 19

8 Mode opératoire 21
8.1 Préparation des échantillons pour analyse 21
8.2 Broyage / Macération de l'échantillon 21
8.3 Détection *in planta* par dN-PCR 22
8.4 Détection *in planta* par PCR temps réel 25
8.5 Détection *in planta* par isolement 27
8.6 Identification, par dN-PCR, des souches isolées 29
8.7 Identification par PCR temps réel des souches isolées 29

9 Résultats 30
9.1 Contrôle de la validité des résultats 30
9.2 Calculs et expression des résultats 31

10 Caractéristiques de performance de la méthode 38

Annexe 1 – Recette des tampons et milieux utilisés pour la détection de *Xea* 40

Bibliographie 41

Introduction

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

Xanthomonas euvesicatoria pv. allii (*Xea*) est l'agent responsable du dépérissement bactérien de l'oignon, une des contraintes sanitaires majeures de la culture des Alliacées.

Xea est pathogène des Alliacées, notamment de l'ail (*Allium sativum* L.), du poireau (*Allium porrum* L.), de la ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.), de l'échalote (*Allium ascallonicum* L.), de la ciboule (*Allium fistulosum* L.) et de l'oignon (*Allium cepa* L.) (8). La maladie tend à être plus sévère chez l'oignon.

Il a été montré que la bactérie pouvait être présente dans les semences d'oignons (9), que la maladie pouvait se diffuser à large échelle, notamment par les échanges commerciaux de semences.

Les analyses basées sur la rep-PCR, l'AFLP et le séquençage partiel des gènes de ménage (1, 3, 4, 8) ont placé *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii* dans le cluster génétique 9.2 de *X. axonopodis* (5). Il existe une forte diversité génétique intra-pathovar pour *Xea*.

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 (ou de statut suspecté) et les isolements bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.
Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté (ou de statut suspect) et les isolements bactériens en résultant doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les bactéries.
Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté (ou de statut suspect) et/ou avec les isolements bactériens en résultant doit être désinfecté.

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

1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode concerne la détection et l'identification de *Xanthomonas euvesicatoria pv. allii*, l'agent responsable du dépérissement bactérien de l'oignon, une des contraintes sanitaires majeures de la culture des Alliacées. Elle s'appuie sur la combinaison tests moléculaires et de test microbiologique d'isolement bactérien.

Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles et tiges fraîches d'Alliacées symptomatiques ou asymptomatiques, ainsi que sur semences d'oignons (*Allium cepa* L.).

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées
Le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 0,25g de matériel végétal frais et au maximum 1g de matériel végétal frais.

Remarque *: Les symptômes apparaissent initialement sur feuilles comme des mouchetures blanches, des taches pâles, ou des lésions lenticulaires avec des bords huileux. Les lésions huileuses grossissent rapidement, devenant brunes. Quand la maladie progresse, les lésions fusionnent et provoquent un dépérissement des extrémités et une brûlure des feuilles les plus âgées (chlorose, puis nécrose). A cause de la réduction du feuillage, les plantes se rabougrissent et les bulbes sont plus petits.*

A partir des semences d'oignons
Le laboratoire réalise l'analyse sur des sous-échantillons de 10 grammes. Le nombre de sous-échantillons à tester est déterminé selon les exigences du client, sur la base d'un seuil de détection souhaité et d'un risque de première espèce fixé.

Remarque *: La matrice « semences » est une matrice particulière :*

1) *de par sa nature et les taux de contamination qu'elle peut porter. Dans le cas de* Xea*, 4 graines contaminées sur 10000 suffisent à déclencher une épidémie (10). Un plan d'échantillonnage adapté est nécessaire afin de pouvoir répondre aux exigences de détection du client (exemple : exigence de détection d'une graine contaminée sur 10000 graines).*
2) *de par la présence d'une flore saprophyte importante. Sur semences d'oignons, la flore saprophyte est estimée à 10^6 CFU/g de semences (6). Cette flore saprophyte rend notamment difficile l'isolement de la bactérie-cible sur boîte de culture, car les saprophytes colonisent rapidement les boîtes même sur milieu semi-sélectif.*
3) *de par la présence de traitements de semences avec effets bactéricides ou bactériostatiques, pouvant impacter la performance des outils de détection. Dans le cas des tests moléculaires présentés ci-après, l'effet des principaux traitements de semences utilisés sur semences d'oignons a été évalué et permet de considérer la présence de traitement de semences comme non pénalisante pour la mise en œuvre de ces tests.*

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

2 Documents de référence

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

	Référence	Titre
1	**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"
2	**Rapport de validation RF-PJ/XEA01-V1-FR Juillet 2015**	Rapport de caractérisation et de validation de la méthode de détection de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons

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.

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

4 Principe de la méthode

Contexte général :

Les laboratoires mettant en œuvre la détection de *Xea* **doivent réaliser 2 tests de détection *in planta* suivis d'un test moléculaire d'identification sur souches bactériennes isolées :**

1) Détection *in planta* par test moléculaire : extraction d'ADN puis duplex-nested PCR (dN-PCR) ou PCR temps réel (§8.3 ou §8.4)
2) Détection *in planta* par isolement– §8.5
3) Identification, par tests moléculaire (dN-PCR ou PCR temps réel) des souches isolées (§8.6 ou §8.7).

Le test de dN-PCR conventionnelle et le test de PCR temps réel présentent des résultats de performance quasiment équivalents et peuvent être **utilisés indépendamment** par les laboratoires en détection et/ou en identification. La dN-PCR présente un seuil de détection légèrement plus performant, mais aussi un risque de faux-positifs un peu plus élevé et elle n'inclut pas de contrôle interne contrairement à la PCR temps réel.
Pour la parfaite information du client, le rapport d'analyse devra toutefois préciser la technique de biologie moléculaire qui a été utilisée pour l'analyse à la fois en détection le cas échéant et en identification le cas échéant (voir §9.2.6).

On notera que 2 tests de détection basés sur des principes biologiques différents (isolement et biologie moléculaire) doivent être réalisés. Si le test d'isolement est réalisé en premier et que l'identification de *X. euvesicatoria* pv. *allii* est réalisée avec succès, le test moléculaire de détection n'est pas nécessaire.
Toutefois, il est recommandé de réaliser les 2 tests de détection simultanément car si l'isolement est réalisé en premier et qu'il est négatif, le laboratoire ne pourra pas conclure sans avoir obtenu de résultats avec le test moléculaire de détection.

Présentation des tests de PCR:

Les deux tests de biologie moléculaire (dN-PCR et PCR temps réel) s'appuient sur l'amplification conjointe de deux séquences d'ADN cibles spécifiques de *Xea* (nommées « PIL » et « AVR »), ce qui permet de faire face à la forte diversité génétique intra-pathovar de *Xea*.
Le marqueur PIL, mis en évidence par la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, ou RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), est présent dans environ 70% des souches de *Xea*. Le marqueur AVR, identifié par la méthode AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), est au moins présent chez toutes les souches qui ne possèdent pas le marqueur PIL.
Ainsi, du fait de la complémentarité de ces marqueurs, leur recherche conjointe permet le diagnostic sélectif de l'ensemble des souches connues de *Xea*.
Le test de PCR temps réel intègre en plus un contrôle interne plante.

Le test de duplex Nested-PCR conventionnelle Robène-Soustrade *et al.*, 2010 (6)
La nested-PCR (ou PCR gigogne) consiste à faire deux PCR l'une après l'autre afin principalement d'améliorer le seuil de détection. La première PCR s'effectue sur un extrait d'ADN total du tissu végétal suspecté d'être infecté. La deuxième amplification se fait ensuite directement sur l'amplifiât précédemment obtenu, à l'aide d'un jeu d'amorces spécifiques internes à la première paire utilisée.
Dans le cas présent, il s'agit d'une PCR duplexe mettant en jeu 2 couples d'amorces pour chacune des 2 étapes de PCR, car comme indiqué ci-dessus, l'amplification spécifique se fait à partir de 2 marqueurs différents : le marqueur AVR et/ou le marqueur PIL selon les souches de *Xea*.

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

Le test de PCR temps Robène *et al.*, 2015 (7)

Il ‘s’agit d’une PCR temps réel multiplexe impliquant 3 couples d’amorces et 3 sondes différentes :

-amorces Xaa avr14 et sonde associée au fluorophore FAM : permettant de détecter la bactérie cible présentant le marqueur AVR ;

-amorces Xaa pili et sonde associée au fluorophore VIC : permettant de détecter la bactérie cible présentant le marqueur PIL ;

-amorces Xaa 5.8S et sonde associée au fluorophore NED ou au fluorophore Cy5 pour le contrôle interne plante.

De même que pour la dN-PCR, une amplification positive sur un des deux marqueurs est suffisante pour déclarer l’échantillon positif. En revanche, contrairement à la dN-PCR, la PCR temps réel comprend en plus un contrôle interne.

Tous les tests intégrés dans la méthode sont qualitatifs, c’est à dire qu’ils donnent un résultat du type « positif » (c’est-à-dire « détecté » ou « identifié ») ou « négatif » (= « non détecté » ou « non identifié »).

Un résultat positif indique la présence de l’organisme cible dans une quantité d’échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

Un résultat négatif indique l’absence de l’organisme cible dans une quantité d’échantillon donnée et dans la limite du seuil de détection de la technique employée.

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

Schéma de détection

Les différents tests constituant la méthode développée dans le document s'intègrent dans le schéma de détection suivant :

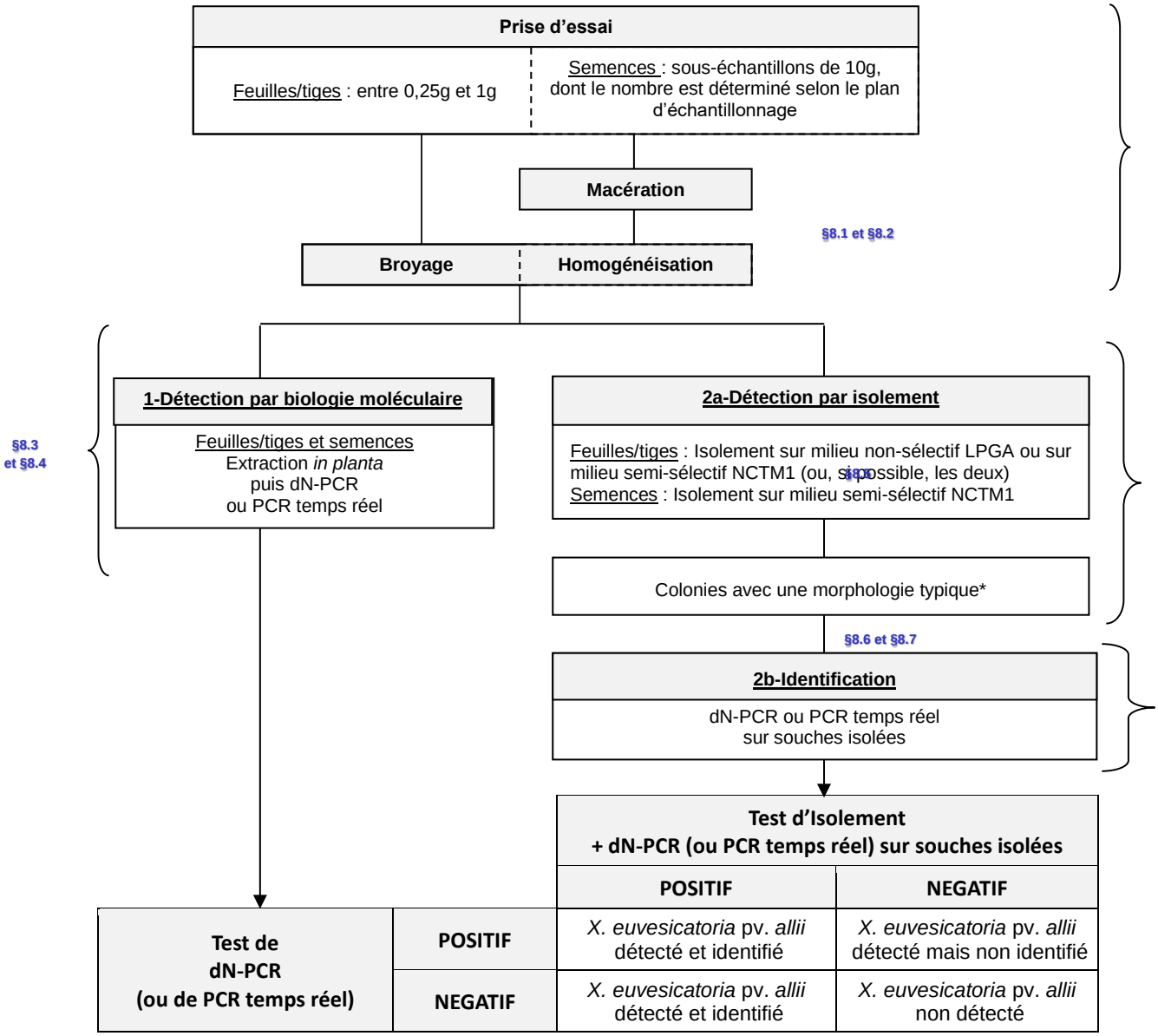


Figure 1 : Schéma de détection et d'identification de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons.

**L'absence de colonies avec morphologie typique équivaut à un résultat d'isolement négatif.*

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

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/milieux de culture ainsi que pour les étapes de préparation des échantillons (préparation des suspensions bactériennes) 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 amplifiâts) 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'ADN, mastermix ou core kit commercial de polymerase thermostable, dNTP, amorces, sondes, eau de qualité de biologie moléculaire).

5.2.1 Kit d'extraction d'ADN

La présente méthode a été caractérisée et validée à l'aide du kit DNeasy® Plant mini kit de Qiagen, en suivant le protocole d'extraction et de purification de l'ADN total « Plant Tissue » du fournisseur, en commençant par l'étape décrite dans le manuel : « Déposer 400µl de tampon AP1 et 4µl de RNase A dans chaque tube... ».

5.2.2 Master mix

Les tests de dN-PCR ont été validés avec le mélange réactionnel du kit Gotaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega). Les validations ont été réalisées avec le tampon de master mix contenant le tampon de charge.
Le kit prêt à l'emploi produit par Qualiplante (nPCR Xaa), utilisé selon les préconisations du fournisseur, a également été évalué et donne des résultats équivalents. Il présente l'avantage de réduire le nombre de manipulations et donc le risque d'erreur et de contamination.

Les tests de PCR temps réel ont été validés avec le mélange réactionnel du kit Taqman® Universal master mix (Applied Biosystems).

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

5.2.3 Oligonucléotides

Séquences des amorces pour la dN-PCR

Tableau 3: Séquences des amorces de la dN-PCR.

Etape	Cible	Amorces	Séquence (5'-3')	Taille du fragment généré
Primaire	Xaa-Pili	F : PXaa1U R : PXaa1L	GGC TCT AAT ACG ACG TTG ACG AT AAA TTC ATG CGC GTT TTC AAT AG	694/697pb(1)
	Xaa-Avr	F : PXaa2U R: PXaa2L	CTC AAG CAG CAG TCG TTT TCA ATG CTT CGA TTG ACA TGC TGT	995pb
Nested	Xaa-Pili	F : NXaa1U R : NXaa1L	TTA CGT CGC AAA CAA TCC AGA TA GGG CAC CAT TGA CAT TAT CAG TT	444/447pb(1)
	Xaa-Avr	F : NXaa2U R : NXaa2L	ATG CCT GGT TTC GTG AA CTA CGG CTC AGC GAC TC	401pb

(1) Pour le marqueur PIL, la taille théorique de l'amplicon de primaire est de 697pb et celle de l'amplicon de nested est de 447pb, toutefois certaines souches (exemple : CFBP6364) présentent une délétion de 3pb rendant possible l'observation d'amplicons de 694pb en primaire et d'amplicons de 444pb en nested.

Remarque : Ces amorces et leur utilisation en diagnostic ont fait l'objet d'un dépôt de brevet par le CIRAD en France (FR2848222) et aux Pays Bas (NL1024929).

Séquences des sondes et amorces pour la PCR temps réel :

Tableau 4: Séquences des amorces et sondes de la PCR temps réel.

Cible	Amorce ou Sonde	Séquence (5'-3')	Taille du fragment généré
Xaa-Pili	Xaa-pil F Xaa-pil R **P-Xaa-pil**	CAC GAC CAC TGC TGG AAC A CAT ATC GAC CGG CAA GGT TT **VIC** – TGG TGG CCT CAG GAG - **MGB**	56bp
Xaa-Avr	Xaa-avr F Xaa-avr R **P-Xaa-avr**	TCG AGC AGC AGT CGT TTT CA GGA GGC GTA GAC GCC TTA CT **FAM** – TGC TGA GTC AGC CTC - **MGB**	74bp
Plante	Xaa-5.8S F Xaa-5.8S R **P-Xaa-5.8S**	GCG AAA TGC GAC ACT TGG TGT GA GCG CAA CTT GCA TTC AAA GA **NED(2)** – ATC CCG TGA ACC ATC G - **MGB**	69pb

(2) Pour le contrôle interne plante, les laboratoires ont la possibilité d'utiliser le fluorophore NED ou le fluorophore Cy5, selon le thermocycleur temps réel utilisé (par exemple : le fluorophore NED sera utilisé sur thermocycleur StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems, alors que le fluorophore Cy5 sera utilisé sur thermocycleur Rotor-Gene Q de Qiagen et LightCycler® 480 System de Roche).

Remarque :
-Pour la PCR temps réel, les différentes amorces et sondes sont commandées avec a minima une méthode de purification HPLC (High Performancy Liquid Chromatography).
-D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

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

5.3 Tampons

5.3.1 Composition et préparation

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

-Tampon de broyage Tris 10mM (recette disponible en annexe 1)
-Tampons d'extraction d'ADN (par exemple : ceux du DNeasy® Plant mini kit de Qiagen)
-Tampon de migration (par exemple : TAE ou TBE)
-Tampon de charge (si celui-ci n'est pas intégré au tampon du master mix cf. §5.2.2)

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.

5.4 Milieux de culture

Milieu de culture non-sélectif LPGA (recette disponible en annexe 1).
Milieu de culture semi-sélectif NCTM1 (recette disponible en annexe 1).

5.4.1 Contrôle

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isolements. En conséquence, chaque lot de fabrication d'un milieu (commercial ou fabriqué au sein du laboratoire), doit être contrôlé avant ou simultanément à sa première utilisation. Ces contrôles portent sur la qualité physique et microbiologique. Concernant le contrôle de qualité microbiologique, il sera vérifié *a minima* la bonne croissance de la souche cible et l'absence de contaminants.

5.4.2 Conservation

Les milieux de culture commerciaux doivent être stockés et conservés selon les recommandations du fournisseur.
En l'absence de préconisations, ou dans le cas de milieux fabriqués au sein du laboratoire, ceux-ci doivent être utilisés dans un délai de trois mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les trois mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu peut être réalisé permettant de prolonger son utilisation d'un mois. Le stockage des milieux doit être réalisé, à une température ≤ 20°C, de préférence à l'abri de la lumière.
Quelle que soit l'origine du milieu (commerciale ou interne au laboratoire), en cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou de prolifération microbienne, il convient d'éliminer les milieux concernés.

Remarque : dans le cas des milieux contenant des antibiotiques, il est préférable de les utiliser peu de temps après leur fabrication pour avoir une efficacité d'action optimale. Ils ne devront pas être utilisés au-delà de deux mois après leur fabrication (sauf indications contraires du fournisseur). Ils devront alors être conservés à une température réfrigérée ≤ 20°C, à l'abri de la lumière. Au moment de l'utilisation des milieux, il sera alors nécessaire d'attendre qu'ils soient revenus à température ambiante.

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

5.5 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

-Anses d'inoculation stériles.

-Solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70% : désinfection superficielle sur le végétal.

- 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 DNA Away ou équivalent : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.

5.6 Contrôles et témoins

L'utilisation de témoins de manipulation est obligatoire pour la mise en œuvre de chaque test décrit dans la méthode. L'utilisation de ces témoins sert à valider le bon déroulement des différentes étapes de l'analyse. La nature des témoins à utiliser dans chaque test est décrite dans les paragraphes ci-après.

5.6.1 Pour la détection *in planta* par dN-PCR ou par PCR temps réel

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de dN-PCR ou de PCR temps réel pour la détection *in planta* sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS ou T-) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (feuilles/tiges d'Alliacées non infectées ou semences d'oignons non infectées selon le type d'échantillon pour analyse).
  Remarque : Il est possible d'utiliser des feuilles/tiges d'Alliacées non infectées congelées comme témoins négatifs de processus quand l'échantillon pour analyse est constitué de feuilles/tiges fraîches.

- un **témoin positif de processus** (T+) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (feuilles/tiges d'Alliacées infectées ou semences d'oignons infectées selon le type d'échantillon pour analyse). Il donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser un échantillon de référence naturellement contaminé ou un échantillon artificiellement contaminé par dopage avec une souche *Xea* de référence.
  En complément du témoin positif de processus à concentration bactérienne élevée, il est conseillé, dans la mesure du possible, d'utiliser un **témoin positif de PCR** en limite de détection (il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence d'ADN cible en quantité proche du seuil de détection).

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

Ce témoin permettra, au sein du laboratoire, de détecter de petites anomalies de déroulement du test, susceptibles d'entraîner la non-détection d'échantillons faiblement infectés.
Ce témoin est choisi par le laboratoire parmi les échantillons ayant fourni, lors d'études préalables, des résultats suffisamment constants. Il peut s'agir de témoins positifs produits en interne (suspension bactérienne de référence à une concentration déterminée, solution d'ADN cible à une concentration déterminée) ou de témoins commerciaux utilisés à une dilution appropriée, lorsqu'ils existent et sont disponibles.

- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Remarque : Dans la présente méthode, la souche utilisée comme souche Xea *de référence est la souche pathotype issue de collection internationale (souche CFBP 6107 : elle a été isolée sur Allium fistulosum L. au Japon en 1998). Elle possède les 2 marqueurs AVR et PIL.*
D'autres souches Xea *issues de collections internationales ou isolées par le laboratoire, préalablement vérifiées sur milieux et en test moléculaire peuvent également être utilisées comme souches témoins de référence. Il est conseillé toutefois de s'assurer que la souche choisie pour constituer les témoins positifs possède bien les 2 marqueurs, afin de valider la double amplification (à défaut deux souches de référence, possédant chacune un marqueur, peuvent être utilisées). Ceci est particulièrement important en PCR temps réel pour laquelle les amplifications des marqueurs PIL et AVR impliquent des fluorophores différents : ainsi on distinguera les témoins positifs de processus Tpil+ et Tavr+, mais cette distinction sera artificielle quand le témoin positif de processus sera produit à partir d'une souche de référence possédant les 2 marqueurs.*
La manipulation de ces souches témoins positifs doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et/ou dans le temps, des échantillons à analyser, de façon à éviter toute contamination accidentelle des échantillons.

Les témoins de processus doivent faire l'objet de deux puits PCR. Les témoins de PCR peuvent faire l'objet d'un puits unique.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

Remarque : Les travaux méthodologiques n'ayant pas révélé de problème particulier d'inhibition liée à la matrice Alliacées, que ce soit sur feuilles ou semences, l'utilisation d'un témoin d'inhibition n'est pas exigée. Toutefois en cas de suspicion d'inhibition (résultat de dN-PCR négatif et isolement positif), l'analyse de dN-PCR peut être réitérée en incluant un témoin d'inhibition pour tester l'hypothèse d'inhibition. Selon les résultats obtenus, l'utilisation de ce témoin pourra être généralisée au sein du laboratoire.
On notera que la PCR temps réel comprend un contrôle interne qui fait office de témoin d'inhibition. En cas de suspicion d'inhibition ce test peut donc être privilégié à celui de la dN-PCR, pour confirmer ou infirmer une suspicion d'inhibition. Le paragraphe 9.2.2 précise alors la conduite à adopter en présence d'inhibiteurs.

5.6.2 Pour la détection *in planta* par isolement

Pour la détection *in planta* par isolement, il est nécessaire de prévoir *a minima* un témoin négatif de processus. Le témoin négatif de processus utilisé pour les tests PCR (cf. §5.6.1) peut être utilisé comme témoin négatif de processus pour la détection par isolement. Si un témoin négatif de processus différent est utilisé, il devra répondre aux mêmes exigences que celles décrites pour le témoin négatif de processus utilisé en PCR (cf. §5.6.1).

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

5.6.3 Pour l'identification par dN-PCR ou par PCR temps réel des souches isolées

Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, les témoins à intégrer dans le test de dN-PCR ou de PCR temps réel pour l'identification sur souches isolées sont les suivants :

- un **témoin négatif de processus** (TS ou T-) : suspension ne contenant pas l'organisme cible (donc constituée uniquement de l'eau de qualité analytique stérilisée), traitée dans les mêmes conditions que les suspensions bactériennes à analyser, déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation.

- un **témoin positif de processus** (T+) : il s'agit d'un témoin de PCR contenant la séquence cible, traitée dans des conditions similaires aux suspensions bactériennes à analyser, déclaré contaminé à l'issue de la manipulation. Ce témoin donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la PCR d'identification.

  Remarque: il est possible d'utiliser une suspension bactérienne réalisée à partir d'une souche Xea *de référence (cf. §5.6.1) préparée à l'avance et/ou inactivée. Il est également possible d'utiliser des extraits d'ADN positifs par exemple résultant de l'extraction du témoin positif de processus utilisé pour la détection in planta par PCR.*

- un **témoin négatif de PCR** (A- ou Teau) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR.

Prévoir au moins un puits par témoin.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la méthode MOA 022.

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.
Les considérations métrologiques sont celles de la MOA022 ou de la norme ISO8655 (version en vigueur).

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

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

Tableau 5: EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	Se référer à la norme ISO8655 ou utiliser les EMT suivantes : **volume < à 10mL** : EMT = ± 10% **volume ≥ à 10mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : EMT = ± 4°C (pour une température cible de +5°C) **Congélateur** : ≤ -18°C **bain thermostaté** : EMT = ± 3°C **thermocycleur*** : EMT justesse = ± 1°C ; EMT homogénéité = ± 2°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 / homogénéisateur

Pour la matrice végétale de type feuille ou tige d'Alliacées, la méthode a été validée en utilisant un broyeur 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.

Pour la matrice végétale de type semences d'oignons, la méthode a été validée en utilisant un broyeur homogénéisateur Stomacher® pour l'homogénéisation des macérâts de semences, après la phase de macération. Toutefois, tout autre procédé d'homogénéisation permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.

6.2 Thermocycleur

6.2.1 Thermocycleur pour la dN-PCR

Le protocole a été évalué et validé sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) et sur GeneAmp® PCR System9700 (Applied Biosystems). D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

6.2.2 Thermocycleur pour la PCR temps réel

Le protocole a été évalué et validé sur plusieurs types de thermocycleurs temps réel : StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), Rotor-Gene Q (Qiagen) et LightCycler® 480 System (Roche Life Science). D'autres thermocycleurs temps réel peuvent être utilisés dans la mesure où ils sont capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM », « VIC » et « NED » ou « Cy5 » (ou d'autres fluorophores de spectre équivalent) et dans la mesure où ils produisent des résultats équivalents.

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

6.3 Appareillage et matériels pour le test d'isolement

Pour la mise en œuvre du test d'isolement bactérien, le laboratoire devra également disposer des appareils suivants :

-Incubateur bactériologique assurant une température de +28°C ;
-Enceinte réfrigérée à +5°C ;
-Incubateur ≤ 20°C ;
-PSM ou hotte stérile permettant d'assurer des conditions axéniques ;
-Congélateur : ≤ -18°C ;
-Autoclave.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées
Le laboratoire réalise l'analyse sur un minimum de 0,25g de matériel végétal frais et au maximum 1g de matériel végétal frais.
En dessous de 0,25g de matériel végétal, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

A partir des semences d'oignons
Le laboratoire réalise l'analyse sur des sous-échantillons de 10 grammes.
Le nombre de sous-échantillons de 10g à tester est déterminé selon les exigences du client, sur la base d'un seuil de détection souhaité et d'un risque de première espèce fixé. Un gramme de semences d'oignons contient entre 250 et 400 graines.
Ainsi, pour la détection d'une semence contaminée sur 10 000, avec un risque de première espèce alpha = 5%, le nombre de sous-échantillons de 10 grammes à tester est de 12.
Pour la détection d'une semence contaminée sur 10 000, avec un risque de première espèce alpha = 1%, le nombre de sous-échantillons de 10 grammes à tester est de 19.
Pour la détection d'une semence contaminée sur 30 000, avec un risque de première espèce alpha = 5%, le nombre de sous-échantillons de 10 grammes à tester est de 36.
Par rapport aux données épidémiologiques dont nous disposons, le plan d'échantillonnage correspondant **à la détection d'une semence contaminée sur 10 000, avec un risque de première espèce alpha = 5%** semble donner le meilleur compromis entre prise de risque et facilité/coût de mise en œuvre de l'analyse.
Si les quantités fournies sont inférieures aux exigences de détection fixées, les analyses sont réalisées sur le nombre maximum de sous-échantillons de 10 grammes qu'il est possible de constituer et des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.
Si les quantités fournies sont supérieures aux exigences de détection fixées, les analyses sont réalisées sur le nombre maximum de sous-échantillons de 10 grammes qu'il est possible de constituer.

Toute matrice
Les feuilles et tiges pour analyse doivent arriver au laboratoire dans un état de fraîcheur approprié (feuilles/tiges turgescentes). Les semences doivent également arriver dans un bon état de conservation (absence de pourriture).
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

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

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.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être le plus court possible.

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées
Le délai 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 7 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.

A partir des semences d'oignons
Le délai entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à un mois. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.
En présence de semences traitées, des dispositions doivent être prises pour la protection de l'utilisateur (port de gants adaptés tout au long de l'analyse). Dans ce cas, il est par ailleurs recommandé d'effectuer un rinçage rapide des semences sous l'eau afin de lessiver en partie le produit de traitement de semences.

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.

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

Tableau 6: Type de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etapes	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai (1)	Feuilles/tiges d'Alliacées	+5°C	**Tout résultat** : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Macération/ Broyage	Macérât/ Broyat végétal	+5°C	**Tout résultat :** 15 jours après envoi du rapport	Tubes / pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Extraction d'ADN	Extraits d'ADN	≤-18°C	**Résultat négatif** : 15 jours après envoi du rapport **Résultat autre que négatif**: 12 mois	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Isolements bactériens	Boîtes d'isolement/ isolat repiqué	+5°C	**Tout résultat** : 15 jours après envoi du rapport	Boîtes de culture parafilmées en conditionnement hermétiques et clairement identifiées Température ambiante Transporteur express avec suivi
Identification PCR	Souches bactériennes identifiées positivement, mises en collection	Selon les modalités de mise en collection (exemple : température ambiante pour les lyophilisats ; température ≤-18°C pour les cryobilles ou les suspensions bactériennes)	**Résultat positif**: 12 mois	Conditionnements hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi

(1) Pour l'étape de prise d'essai, la modalité reliquat de semences n'apparait pas dans la mesure où l'intégralité des semences reçues au laboratoire est analysée (cf. §7.1).

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

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

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées
La prise d'analyse est constituée au minimum de 0,25g et au maximum de 1g de feuilles/tiges d'Alliacées.
Après une décontamination rapide de surface à l'aide de papier absorbant imbibé de solution hydro-alcoolique de titre alcoolique au moins égal à 70%, prélever au scalpel les parties de végétal en bordure de lésions jeunes (sans inclure les nécroses) et les placer dans un sachet de broyage.
En l'absence de symptômes, le prélèvement se fait en bordure du limbe.
Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.
Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

A partir des semences d'oignons
Les sous-échantillons sont constitués de 10 grammes de semences. Le nombre de sous-échantillons est fixé selon le plan d'échantillonnage retenu. Exemple 12 sous-échantillons de 10 grammes doivent être analysés si l'objectif est de détecter au moins une semence contaminée sur 10 000 semences (α=5%).
Entre chaque échantillon à analyser, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

8.2 Broyage / Macération de l'échantillon

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées
Broyer le matériel végétal dans du Tris 10mM stérile selon le ratio masse/volume de 1/20 soit 5mL de Tris pour 0,25g de matériel végétal (ou 10mL pour 0,5g ou encore 20mL pour 1g) à l'aide d'un broyeur à billes, ou de toute autre méthode de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents.

A partir des semences d'oignons
Les sous-échantillons de semences (10g chacun) sont mis à macérer dans 50mL de Tris 10mM stérile pendant 48h à +5°C. Cette phase de macération de 48h au froid permet un relargage plus important des bactéries-cibles sans pour autant augmenter significativement la quantité de flore saprophyte retrouvée sur milieux de culture (9). A l'issue de la macération, chaque sous-échantillon est homogénéisé au Stomacher® ou appareil équivalent (agitation d'environ 30 secondes, à vitesse lente).

Dans tous les cas
A partir du broyat végétal obtenu pour chaque échantillon (analyse sur feuilles/tiges) ou du macérât végétal obtenu pour chaque sous-échantillon (analyse sur semences):

- des isolements sur boîtes de culture sont réalisés selon les indications du §8.5.
- 2mL (approximativement) du broyat/macérât végétal obtenu sont transférés dans des tubes de type Eppendorf® pour la réalisation de l'extraction d'ADN telle que décrite au §8.3.1 ou §8.4.1.

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

Remarque : L'embout porte-cône de la pipette doit être décontaminé entre chaque échantillon si celui-ci se trouve en contact avec le sachet de broyage. L'utilisation de cônes à pointe large peut faciliter le prélèvement du broyat le cas échéant. Enfin, pour des raisons pratiques, le volume nécessaire pour réaliser les isolements (1 x 30 à 50µL ou 2 x 30 à 50µL selon le cas) peut être prélevé à partir des 2mL prélevés pour l'extraction PCR.

Les tubes sont centrifugés environ 10 minutes à 20 000g afin de culoter les bactéries de préférence en conditions réfrigérées (meilleure tenue du culot). Eliminer le surnageant.
Ce culot peut être directement extrait, ou bien être conservé à +5°C pendant quelques heures avant extraction, ou encore être conservé à une température inférieure ou égale à -18°C pendant plusieurs semaines en attente de l'extraction.

Les reliquats de broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

8.3 Détection *in planta* par dN-PCR

Chaque échantillon (pour la matrice feuille/tige), chaque sous-échantillon (pour la matrice semence) fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être déposé deux fois soit au final 2 puits par échantillon ou sous-échantillon (analyse de détection).

8.3.1 Extraction d'ADN

L'ADN total de l'échantillon contenant l'ADN bactérien est extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial (cf. §5.2.1). L'élution de l'ADN total se fait dans 100µl (à titre indicatif 2 x 50µl).
Les extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température ≤-18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.
Après utilisation, les tubes contenant les extraits d'ADN sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

8.3.2 PCR Primaire : mélange réactionnel et amplification

Ce paragraphe concerne la PCR conventionnelle de détection *in planta* et d'identification sur souches bactériennes isolées.

Mélange réactionnel

Tableau 7: Mélange réactionnel de la dN-PCR - étape primaire utilisée en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	**[Solution-mère]** *(exemple)*	**[Puits]**	**Volume pour un puits (µl)** *(pour les concentrations de solutions-mères données)*
Eau ultra pure			12,05
Tampon	5 X	**1 X**	5
MgCl2	25 mM	**1,5 mM**	1,5
dNTP	10 mM	**0,1 mM**	0,25

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

Réactifs	[Solution-mère] *(exemple)*	[Puits]	Volume pour un puits (µl) *(pour les concentrations de solutions-mères données)*
Amorce PXaa1U (PIL)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce PXaa1L (PIL)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce PXaa2U (AVR)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce PXaa2L (AVR)	5 µM	**0,2 µM**	1
Taq Polymerase	5U/µl	**1U**	0,2

Total avant ajout ADN	23
ADN	2
Total avec ADN	25

Remarque : Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 23µl de mélange réactionnel et 2µl d'ADN (ou d'eau pour le témoin A-).

Programme d'amplification

Tableau 8: Programme d'amplification de la dN-PCR - étape primaire.

Température (°C)		Durée	Cycles
Dénaturation initiale	94	5 minutes	
Dénaturation	95	1 minute	40
Hybridation	63	1 minute	
Elongation	72	2 minutes	
Elongation finale	72	5 minutes	
Conservation	12	∞	

Taille des amplifiâts

La taille des amplifiâts générés est de :
- 694/697pb pour l'amplicon PIL avec le couple PXaa1U-PXaa1L ;
- 995pb pour l'amplicon AVR avec le couple PXaa2U-PXaa2L.

8.3.3 PCR Nested : mélange réactionnel et amplification

Ce paragraphe concerne la PCR conventionnelle de détection *in planta* et d'identification sur souches bactériennes isolées.

Dilution

En présence d'échantillons symptomatiques, il est recommandé de diluer les amplifiâts issus de la PCR primaire au 1/100ème dans de l'eau de qualité de biologie moléculaire pour leur utilisation en PCR nested. Lors de la dilution, les tubes PCR de la primaire doivent être ouverts avec précaution pour éviter la création d'aérosols susceptibles d'entrainer des contaminations croisées.

Mélange réactionnel

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

Tableau 9: Mélange réactionnel de la dN-PCR - étape nested utilisée en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	[Solution-mère] *(exemple)*	[Puits]	Volume pour un puits (µl) *(pour les concentrations de solutions-mères données)*
Eau ultra pure			13,05
Tampon	5 X	**1 X**	5
MgCl2	25 mM	**1,5 mM**	1,5
dNTP	10 mM	**0,1 mM**	0,25
Amorce NXaa1U (PIL)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce NXaa1L (PIL)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce NXaa2U (AVR)	5 µM	**0,2 µM**	1
Amorce NXaa2L (AVR)	5 µM	**0,2 µM**	1
Taq Polymerase	5U/µl	**1U**	0,2

Total avant ajout ADN	24
ADN	1
Total avec ADN	25

Remarque :
-Le volume final est de 25µl dans chaque puits soit 24µl de mélange réactionnel et 1µl d'amplifiâts de la PCR primaire (éventuellement dilués au 1/100) (ou d'eau pour le témoin A-).
-Lors de l'ajout des amplifiâts de la PCR primaire, les tubes PCR doivent être ouverts avec précaution pour éviter la création d'aérosols susceptibles d'entrainer des contaminations croisées.

Programme d'amplification

Tableau 10: Programme d'amplification de la dN-PCR - étape nested.

Température (°C)		Durée	Cycles
Dénaturation initiale	95	5 minutes	
Dénaturation	94	30 secondes	30
Hybridation	57	30 secondes	
Elongation	72	40 secondes	
Elongation finale	72	5 minutes	
Conservation	12	∞	

Taille des amplifiâts

La taille des amplifiâts générés est de :
- 444/447pb pour l'amplicon PIL avec le couple PXaa1U-PXaa1L ;
- 401pb pour l'amplicon AVR avec le couple PXaa2U-PXaa2L.

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

8.3.4 Electrophorèse et révélation

Dans le cadre des analyses de détection réalisées sur extrait végétal, il n'est pas nécessaire de déposer sur gel les amplifiâts à l'issue de la PCR primaire, seuls les amplifiâts issus de la PCR nested sont déposés.

Déposer environ 10µL de l'amplifiât, soit directement soit mélangés à du tampon de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) selon le type de tampon utilisé précédemment (cf. §5.3.1), sur un gel d'agarose à 3% (valeurs indicatives).
Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.
Effectuer l'électrophorèse dans du tampon de migration à une concentration identique à celle du tampon utilisé pour réaliser le gel (à titre indicatif, la migration peut se faire avec les paramètres suivants : 100 volts durant 1 heure).
La coloration du gel se fait dans un bain de bromure d'éthidium (BEt) et la révélation sous UV. 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 peuvent également être utilisés pour la préparation du bain de coloration.

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.

8.4 Détection *in planta* par PCR temps réel

Chaque échantillon (pour la matrice feuille/tige), chaque sous-échantillon (pour la matrice semence) fait l'objet d'une extraction unique, mais chaque extrait doit être déposé deux fois soit au final 2 puits par échantillon ou sous-échantillon (analyse de détection).

8.4.1 Extraction d'ADN

L'ADN total de l'échantillon contenant l'ADN bactérien est extrait et purifié à l'aide d'un kit commercial (cf. §5.2.1). L'élution de l'ADN total se fait dans 100µl (à titre indicatif 2 x 50µl).
Les extraits d'ADN peuvent être conservés plusieurs semaines, à une température ≤-18°C, en attente de la réalisation de l'amplification.
Après utilisation, les tubes contenant les extraits d'ADN sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

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

8.4.2 Mélange réactionnel et amplification

Mélange réactionnel

Tableau 11: Mélange réactionnel de la PCR temps réel utilisé en test de détection (*in planta*) ou en test d'identification sur souches isolées.

Réactifs	[Solution-mère] *(exemple)*	[Puits]	Volume pour un puits (µl) *(pour les concentrations de solutions-mères données)*
Eau ultrapure			1,92
Master mix	2X	1X	10
Xaa-pil F	20µM	1,6µM	1,6
Xaa-pil R	20µM	1,6µM	1,6
Sonde Taqman P-Xaa-pil (VIC)	10µM	0,075µM	0,15
Xaa-avr F	20µM	1,2µM	1,2
Xaa-avr R	20µM	1,2µM	1,2
Sonde Taqman P-Xaa-avr (FAM)	10µM	0,05µM	0,1
Xaa-5.8S F*	20µM	0,065µM	0,07*
Xaa-5.8S R*	20µM	0,065µM	0,07*
Sonde Taqman P-Xaa-5.8S (NED)*	10µM	0,05µM	0,1*

Total avant ajout ADN	18
ADN	2
Total avec ADN	20

Remarque :
-Le volume final est de 20µl dans chaque puits soit 18µl de mélange réactionnel et 2µl d'ADN (ou d'eau pour le témoin A-).
-Lorsque le test de PCR temps réel est utilisé en identification, il est possible de remplacer les amorces et la sonde 5,8S (*) par un volume équivalent d'eau ultra pure dans le mélange réactionnel puisque la PCR d'identification se réalise sur suspensions bactériennes (absence de matrice végétale).

Programme amplification

Tableau 12: Programme d'amplification de la PCR temps réel.

Température (°C)		Durée	Cycles
Dénaturation initiale	50	2 minutes	
	95	10 minutes	
Dénaturation	95	15 secondes	40
Hybridation/ Elongation*	60	1 minute	

** la mesure de fluorescence (en FAM, VIC et NED ou Cy5) se fait à l'issue de cette étape et à chaque cycle.*

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

8.5 Détection *in planta* par isolement

8.5.1 Isolement

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées : l'isolement se fait à partir du broyat pur sur une boîte de milieu non sélectif LPGA, ou sur une boîte de milieu semi-sélectif NCTM1, ou (si possible) les deux.

A partir des semences d'oignons : pour chaque sous-échantillon, un isolement est réalisé, à partir du macérât pur sur deux boîtes de milieu semi-sélectif NCTM1.

En conditions axéniques, prélever et déposer, par boîte de culture, 50µL du broyat/macérât végétal obtenu selon les indications du §8.2.
Réaliser un étalement par épuisement en 3 secteurs (isolement 3 secteurs) à l'aide d'une anse stérile.

8.5.2 Incubation

A partir des feuilles ou tiges d'Alliacées : incuber les boîtes de culture ensemencées à +28 °C pendant 2 à 3 jours.

A partir des semences d'oignons : incuber les boîtes de culture ensemencées à +28 °C pendant 3 à 4 jours.

8.5.3 Lecture

Observer les boîtes après le temps de croissance indiqué au §8.5.2.

8.5.4 Repiquage pour identification

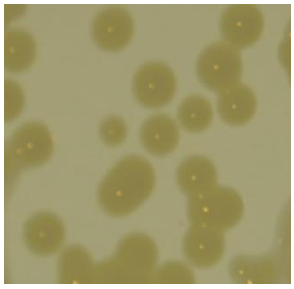
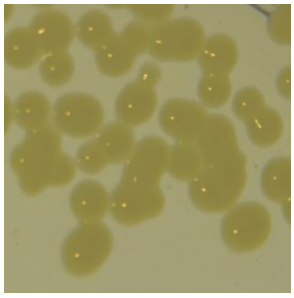
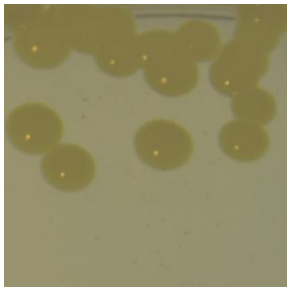
Tout échantillon (ou sous-échantillon) présentant au moins une colonie typique *Xea* (ou douteuse) sur au moins une boîte de culture (quel que soit le milieu) doit faire l'objet d'une identification.

Xea se caractérise par des colonies jaunes, rondes, opaques, bombées, muqueuses et à bords réguliers sur milieu LPGA comme sur milieu NCTM1.

Le tableau ci-après illustre, à titre d'exemple, la morphologie des colonies de la souche pathotype isolée dans différentes conditions.

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

Tableau 13 : Illustration de la morphologie des colonies de la souche pathotype de *Xea* isolée dans différentes conditions expérimentales (photos : sources Anses).

Conditions expérimentales	Milieu LPGA	Milieu NCTM1
Isolement réalisé à partir de feuilles d'oignons- souche CFBP 6107 (après 2 jours de croissance à +28°C)		 1cm
Isolement réalisés à partir de semences d'oignons- souche CFBP 6107 (après 3 jours de croissance à +28°C)	Sans objet	

L'identification des colonies typiques *Xea* (ou douteuses) se fait à l'aide d'un des deux tests suivants :

-dN-PCR d'identification (§8.6)
-PCR temps réel d'identification (§8.7)

Pour ce faire, repiquer au moins une colonie typique (ou douteuse) par échantillon sur milieu LPGA. Laisser incuber à +28°C pendant environ 24h, pour obtenir une culture « fraîche » et se référer au paragraphe correspondant au test à mettre en œuvre.

Remarque : En cas de doute, ne pas hésiter à multiplier le nombre de repiquages de colonies pour identification par échantillon.

Quand l'isolement 3 secteurs donne lieu à des colonies suffisamment isolées, le repiquage peut être rendu optionnel, et l'identification PCR peut se faire directement à partir d'une colonie isolée, prélevée sur la boîte d'isolement.

Les boîtes d'isolement et les souches isolées doivent être conservées selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

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

8.6 Identification, par dN-PCR, des souches isolées

Le test d'identification par dN-PCR est lié à la méthode d'analyse MOA 022. Il ne peut être appliqué qu'en respectant les préconisations de cette méthode.

Chaque souche isolée fait l'objet d'une suspension bactérienne et est déposée une fois, soit 1 puits par souche à identifier (analyse d'identification).

8.6.1 Préparation des suspensions bactériennes

Suspendre, à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, environ 1µL de la culture fraîche de 24h d'une colonie typique de *Xea* ou douteuse (cf. §8.5.4) (ou, en l'absence de repiquage, suspendre directement la colonie isolée prélevée sur la boîte d'isolement) dans 1mL d'eau de qualité analytique stérilisée puis agiter vigoureusement pour obtenir une suspension bien homogène. Le tube peut alors être utilisé directement pour la réalisation de l'amplification ou stocké à une température inférieure ou égale à -18°C en attente de réalisation de l'amplification. Après utilisation, les tubes contenant les suspensions bactériennes sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

Remarque : A noter que l'étape de lyse thermique (ébullition du tube de la suspension bactérienne pendant au moins une minute puis mise dans la glace pendant quelques minutes et vortexage vigoureux) n'est pas obligatoire car elle n'est pas justifiée d'un point de vue technique, elle peut toutefois être réalisée notamment si elle est justifiée par des contraintes organisationnelles de niveau de confinement (manipulation de bactéries inactivées à l'issue de cette étape).

8.6.2 Amplification, électrophorèse et révélation

Pour les conditions d'amplification, d'électrophorèse et de révélation se référer aux indications des §8.3.2, §8.3.3 et §8.3.4, tout en tenant compte des indications suivantes.

Quand l'amplification est réalisée à partir d'une suspension bactérienne ou à partir d'ADN extrait de culture pure (par exemple à l'aide d'un kit commercial d'extraction d'ADN), la cible est largement excédentaire et des adaptations du protocole de détection sont nécessaires pour réduire le risque de contaminations. Deux alternatives sont possibles :

-réaliser uniquement l'amplification primaire (cf. §8.3.2) et poser le diagnostic sur la présence ou non d'un fragment d'ADN de 694/697 et/ ou 995 pb après migration des amplifiâts de la PCR primaire.

-réaliser la nested-PCR à partir des amplifiâts issus de la PCR primaire dilués au 1/100, comme préconisé dans le cas des échantillons symptomatiques, selon les indications du §8.3.3.

8.7 Identification par PCR temps réel des souches isolées

Le test d'identification par PCR temps réel est lié à la méthode d'analyse MOA 022. Il ne peut être appliqué qu'en respectant les préconisations de cette méthode.

Chaque isolat fait l'objet d'une extraction unique et chaque extrait bactérien est déposé une fois soit 1 puits par souche à identifier (analyse d'identification).

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

8.7.1 Préparation des suspensions bactériennes

Les modalités de préparation et de conservation des suspensions bactériennes pour l'identification par PCR temps réel sont les mêmes que pour l'identification par dN-PCR (cf. 8.6.1).

8.7.2 Amplification

Pour les conditions d'amplification se référer aux indications du §8.4.2.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La vérification de la conformité à l'attendu pour les témoins est un préalable à l'interprétation des résultats des échantillons soumis à analyse. Les résultats attendus pour les témoins utilisés dans chaque test sont décrits dans les paragraphes ci-après.

9.1.1 Pour la détection *in planta* par PCR conventionnelle ou par PCR temps réel

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

Tableau 14: Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR.

Type de contrôle	Résultats attendus**		
	Puits 1	Puits 2	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	-	NEGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	(-*)	NEGATIF

** La duplication de ce témoin est facultative.*

*** Le résultat d'un puits de PCR conventionnelle est positif s'il présente une bande à la taille attendue pour au moins un des deux marqueurs (marqueur AVR ou marqueur PIL) (cf. §5.2.3); il est négatif s'il ne présente aucune bande aux tailles attendues pour les deux marqueurs.*

Le résultat d'un puits de PCR temps réel est positif si, pour au moins un des 2 marqueurs cibles Xea *(AVR ou PIL), il présente une courbe d'amplification exponentielle donnant une intersection avec la ligne seuil avec une valeur de Ct ≤ cut-off (voir §9.2.2).*

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour chacun des 2 marqueurs cibles Xea *(AVR ou PIL)*:

- *il ne présente pas de courbe d'amplification*
- *ou il ne présente pas de Ct*
- *ou il présente une courbe non exponentielle*
- *ou il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.*

En plus de ces différentes conditions sur les 2 marqueurs Xea*, il est attendu que le marqueur plante donne lieu à une amplification positive pour confirmer l'absence d'inhibiteurs de PCR et pour valider le résultat négatif sur les marqueurs cibles* Xea*.*

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

9.1.2 Pour la détection *in planta* par isolement

Pour valider les résultats d'isolement issus des échantillons, il faut préalablement, dans le cadre de la lecture (§8.5.3) des boîtes de culture ensemencées pour les témoins :

-s'assurer de l'absence de colonies typiques de Xea sur les boîtes d'isolement du témoin négatif de processus ;

-et, lorsqu'un témoin positif de processus a été mis en œuvre pour l'isolement, s'assurer de la présence de colonies typiques de Xea sur les boîtes d'isolement du témoin positif de processus.

9.1.3 Pour l'identification, par PCR conventionnelle ou par PCR temps réel, des souches isolées

L'analyse de PCR d'identification est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Tableau 15: Résultats attendus pour les différents témoins utilisés en PCR d'identification.

Type de contrôle	Résultat attendu*	
	Puits PCR	Final
Témoin négatif de processus (TS)	-	NEGATIF
Témoin positif de processus (T+)	+	POSITIF
Témoin négatif d'amplification (A- ou Teau)	-	NEGATIF

** Le résultat d'un puits de PCR conventionnelle est positif s'il présente une bande à la taille attendue pour au moins un des deux marqueurs (marqueur AVR ou marqueur PIL) (cf. §5.2.3); il est négatif s'il ne présente aucune bande aux tailles attendues pour les deux marqueurs.*

Le résultat d'un puits de PCR temps réel est positif si, pour au moins un des 2 marqueurs cibles Xea *(AVR ou PIL), il présente une courbe d'amplification exponentielle donnant une intersection avec la ligne seuil avec une valeur de Ct ≤ cut-off (voir §9.2.2).*

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour chacun des 2 marqueurs cibles Xea *(AVR ou PIL)*:

- *il ne présente pas de courbe d'amplification*
- *ou il ne présente pas de Ct*
- *ou il présente une courbe non exponentielle*
- *ou il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.*

Il est à noter que dans le cas de la PCR temps réel utilisée en identification sur souche isolée, le marqueur plante ne donne pas lieu à amplification (même si les amorces et sonde 5,8S ont été maintenues dans le mélange réactionnel).

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Pour la détection *in planta* par dN-PCR

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande à la taille attendue pour au moins un des deux marqueurs (marqueur AVR ou marqueur PIL).
Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande aux tailles attendues pour les deux marqueurs.

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

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 16: Interprétation des résultats des échantillons (ou sous-échantillons) en nested-PCR.

Analyse		Résultat	Interprétation
Puits 1	Puits 2		
+	+	**POSITIF**	Test positif
+	-	**PCR (primaire et nested) à refaire**. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif.	
-	-	**NEGATIF**	Test négatif

Les souches *Xea* pouvant présenter soit le marqueur AVR, soit le marqueur PIL, soit les 2 marqueurs, une amplification positive sur un des deux marqueurs est suffisante pour déclarer l'échantillon positif. Il n'est pas demandé au laboratoire de préciser le (ou les) marqueur(s) détecté(s). Seul le résultat final, de type *Xea* détecté/non détecté, doit être indiqué.

Remarque : La distinction entre les bandes d'amplification correspondant aux deux marqueurs, dans les conditions opérationnelles définies, reste difficile, dans la mesure où moins de 50pb séparent les bandes d'amplification.

Dans le cas d'analyse sur semences d'oignons, un sous-échantillon positif suffit à déclarer l'ensemble de l'échantillon positif.

9.2.2 Pour la détection *in planta* par PCR temps réel

Le résultat d'un puits PCR est positif si, pour au moins un des 2 marqueurs cibles *Xea* (AVR ou PIL), il présente une courbe d'amplification exponentielle donnant une intersection avec la ligne seuil avec une valeur de Ct ≤ cut-off[1].

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour chacun des 2 marqueurs cibles *Xea* (AVR ou PIL) :
- il ne présente pas de courbe d'amplification

[1] Une valeur de cut-off peut être définie si nécessaire, pour éviter des résultats faussement positifs en particulier si des valeurs élevées de Ct sont observées et peuvent être interprétées comme des artefacts d'amplification ou de fluorescence ou des contaminations. La valeur de cut-off doit être définie (ou vérifiée) dans chaque laboratoire lors de la première mise en œuvre du test. Une approche basée sur l'analyse de la courbe de ROC (receiver operating characteristic) peut être utilisée pour définir la valeur de cut-off.

A titre indicatif, le cut off pour la détection du marqueur AVR, déterminé sur StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems et sur Rotor-Gene Q de Qiagen et avec le kit Taqman® Universal master mix de Applied Biosystems, dans les conditions de travail du LSV-RAPT, est de l'ordre de 36 Ct.
Le cut off pour la détection du marqueur PIL, déterminé sur StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems et sur Rotor-Gene Q de Qiagen et avec le kit Taqman® Universal master mix de Applied Biosystems, dans les conditions de travail du LSV-RAPT, est également de l'ordre de 36 Ct.

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

- ou il ne présente pas de Ct
- ou il présente une courbe non exponentielle
- ou il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.

En plus de ces différentes conditions sur les 2 marqueurs *Xea*, le marqueur plante[2] doit donner lieu à une amplification positive pour confirmer l'absence d'inhibiteurs de PCR et pour valider le résultat négatif sur les marqueurs cibles *Xea*.

Ainsi pour chaque puits PCR, le résultat du test basé sur les 2 marqueurs cibles *Xea* et le marqueur plante s'interprète de la façon suivante :

Tableau 17: Interprétation des résultats de PCR temps réel par puits, selon les 2 marqueurs *Xea* et le marqueur plante.

		Résultat pour le contrôle interne plante 5,8S (en NED)	
		Positif	**Négatif**
Résultat pour la cible *Xea* (marqueur AVR en FAM, marqueur PIL en VIC)	**Positif pour au moins un des 2 marqueurs *Xea***	Positif	Positif*
	Négatif pour les 2 marqueurs *Xea*	Négatif	**Réitération de la PCR temps réel en diluant les extraits d'ADN au 1/10ème** Si le résultat de la seconde PCR est identique à celui de la première **PCR, le résultat n'est pas interprétable** (présence d'inhibiteurs de la PCR)

** Si la cible est très fortement concentrée, Il peut y avoir une concurrence entre la cible et le contrôle interne qui sera alors peu ou pas visible. Cependant la cible est amplifiée validant ainsi la PCR.*

Les résultats pour les 2 puits s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 18: Interprétation des résultats des échantillons (ou sous-échantillons) en PCR temps réel.

.

Analyse		**Résultat**	**Interprétation**
Puits 1	**Puits 2**		
+	**+**	**POSITIF**	Test positif
+	**-**	**PCR à refaire**. Si à nouveau au moins 1 positif sur 2, le test est interprété comme positif.	
-	**-**	**NEGATIF**	Test négatif

[2] Pour le contrôle interne plante 5,8S, les échantillons constitués de matrice végétale, sortent généralement avec un Ct compris entre 10 et 25 en utilisant le fluorophore NED sur StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems et idem en utilisant le fluorophore Cy5 sur Rotor-Gene Q de Qiagen, avec le kit Taqman® Universal master mix de Applied Biosystems, et, dans les conditions de travail du LSV-RAPT.

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

Les souches *Xea* pouvant présenter soit le marqueur AVR, soit le marqueur PIL, soit les 2 marqueurs, une amplification positive sur un des deux marqueurs est suffisante pour déclarer l'échantillon positif. Il n'est pas demandé au laboratoire de préciser le (ou les) marqueur(s) détecté(s). Seul le résultat final, de type *Xea* détecté/non détecté, doit être indiqué.

Dans le cas d'analyse sur semences d'oignons, un sous-échantillon positif suffit à déclarer l'ensemble de l'échantillon positif.

9.2.3 Pour l'identification, par dN-PCR, des souches isolées

Le résultat d'un puits PCR est positif s'il présente une bande prononcée à la taille attendue[3] pour au moins un des deux marqueurs *Xea* (marqueur AVR ou marqueur PIL).
Le résultat d'un puits PCR est négatif s'il ne présente aucune bande aux tailles attendues pour les deux marqueurs *Xea*.

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 19: Interprétation des résultats des échantillons (ou sous-échantillons) en dN-PCR d'identification.

Analyse Puits	Résultat	Interprétation
+	**POSITIF**	Test positif
-	**NEGATIF**	Test négatif

Les souches *Xea* pouvant présenter soit le marqueur AVR, soit le marqueur PIL, soit les 2 marqueurs, une amplification positive sur un des deux marqueurs est suffisante pour déclarer l'échantillon positif. Tout comme pour les analyses de détection, il n'est pas demandé au laboratoire de préciser le (ou les) marqueur(s) détecté(s). Seul le résultat final, de type *Xea* identifié/non identifié, doit être indiqué.

Tout échantillon (ou sous-échantillon) présentant au moins une souche isolée positive est considéré comme positif.

Dans le cas d'analyse sur semences d'oignons, un sous-échantillon positif suffit à déclarer l'ensemble de l'échantillon positif.

Toute souche bactérienne identifiée positivement doit être conservée selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

[3] La cible est en effet présente de façon excédentaire (PCR d'identification), impliquant l'absence d'ambiguïté dans la visibilité de la bande d'amplification.

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

9.2.4 Pour l'identification, par PCR temps réel, des souches isolées

Le résultat d'un puits PCR est positif si, pour au moins un des 2 marqueurs cibles *Xea* (AVR ou PIL), il présente une courbe de fluorescence exponentielle, donnant une intersection avec la ligne seuil avec une valeur de Ct ≤ cut-off[4].

Le résultat d'un puits PCR est négatif si, pour chacun des 2 marqueurs cibles *Xea* (AVR ou PIL), :
- -il ne présente pas de courbe de fluorescence
- -ou il ne présente pas de Ct
- -ou il présente une courbe non exponentielle
- -ou il présente une courbe présentant une intersection avec la ligne seuil et un Ct > cut-off.

Il est à noter que, dans le cas de la PCR temps réel utilisée en identification sur souche isolée, le marqueur plante ne donne pas lieu à amplification (même si les amorces et sonde 5,8S ont été maintenues dans le mélange réactionnel).

Ainsi pour chaque puits PCR, le résultat du test basé sur les 2 marqueurs s'interprète de la façon suivante :

Tableau 20: Interprétation des résultats de PCR temps réel d'identification par puits

		Résultat pour le contrôle interne plante 5,8S (en NED ou Cy5)	
		Positif	**Négatif**
Résultat pour la cible *Xea* (marqueur AVR en FAM, marqueur PIL en VIC)	**Positif pour au moins un des 2 marqueurs *Xea***		**Positif**
	Négatif pour les 2 marqueurs *Xea*		**Négatif**

Globalement, les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 21: Interprétation des résultats des échantillons (ou sous-échantillons) en PCR temps réel d'identification.

Analyse / **Puits**	**Résultat**	**Interprétation**
+	**POSITIF**	Test positif
-	**NEGATIF**	Test négatif

Les souches *Xea* pouvant présenter soit le marqueur AVR, soit le marqueur PIL, soit les 2 marqueurs, une amplification positive sur un des deux marqueurs est suffisante pour déclarer l'échantillon positif. Tout comme pour les analyses de détection, il n'est pas demandé au laboratoire de préciser le (ou les) marqueur(s) détecté(s). Seul le résultat final, de type *Xea* identifié/non identifié, doit être précisé.

[4] Dans le cadre d'une identification des souches isolées, la cible étant *a priori* excédentaire, les valeurs de Ct obtenues en cas de résultat positif, sont précoces et suffisamment éloignées du cut-off pour ne laisser aucune ambiguïté sur l'interprétation du résultat.

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

Tout échantillon (ou sous-échantillon) présentant au moins une souche isolée positive est considéré comme positif.

Dans le cas d'analyse sur semences d'oignons, un sous-échantillon positif suffit à déclarer l'ensemble de l'échantillon positif.

Toute souche bactérienne identifiée positivement doit être conservée selon les modalités indiquées dans le tableau 6.

9.2.5 Pour la méthode globalement

Le schéma de détection de *Xea* implique la mise en œuvre :

- de **2 tests de détection** simultanément :
  - -dN-PCR (ou PCR temps réel) à partir du broyat / macérât végétal ;
  - -Isolement à partir du même broyat / macérât végétal

-et, selon le résultat de l'isolement, d'un test moléculaire d'identification : dN-PCR (ou PCR temps réel) sur souches isolées.

Les résultats combinés des deux tests de détection et du test d'identification, le cas échéant, s'interprètent de la façon suivante :

Tableau 22: Interprétation des résultats combinés des deux tests de détection et du test d'identification.

		Test d'Isolement + dN-PCR (ou PCR temps réel) sur souches isolées	
		POSITIF	**NEGATIF**
Test de dN-PCR (ou de PCR temps réel) *in planta*	**POSITIF**	***X. euvesicatoria* pv. *allii* détecté et identifié**	***X. euvesicatoria* pv. *allii* détecté mais non identifié**
	NEGATIF	***X. euvesicatoria* pv. *allii* détecté et identifié**	*X. euvesicatoria* pv. *allii* non détecté

Ainsi ***Xea* est détecté et identifié** dans les échantillons pour lesquels les deux tests donnent un résultat positif.
***Xea* est non détecté** dans les échantillons pour lesquels les deux tests donnent un résultat négatif.

En présence de résultats discordants entre les 2 tests de détection :

-***Xea* est détecté et identifié** dans les échantillons pour lesquels le test d'isolement + dN-PCR (ou PCR temps réel) sur souches isolées est positif même si le test de dN-PCR (ou de PCR temps réel) est négatif sur extrait végétal. En effet la présence d'inhibiteurs de la PCR dans la matrice végétale peut expliquer des faux-négatifs en dN-PCR et en PCR temps réel. Dans le cas de la dN-PCR, il est recommandé de mettre en œuvre des analyses complémentaires au sein du laboratoire afin d'expliquer les faux-négatifs obtenus (par exemple : réitération de l'analyse en incluant un témoin d'inhibition). Dans le cas de la PCR temps réel, cette hypothèse sera vérifiée par l'observation du résultat obtenu sur le contrôle interne.

- ***Xea* est détecté mais non identifié** dans les échantillons qui présentent un résultat positif en dN-PCR (ou PCR temps réel) et négatif en isolement + dN-PCR (ou PCR temps réel) sur souches isolées. Les travaux méthodologiques ont montré que ce cas de figure pouvait arriver fréquemment à partir de la matrice semences, la bactérie cible pourtant présente, étant difficile à

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

isoler sur milieu de culture. Le client sera alors informé du fait que la bactérie cible n'a pu être isolée.

Reliquats d'échantillons : Voir §7.3.

9.2.6 Formulation du résultat sur le rapport d'analyse

Le rapport d'analyse présentera un résultat d'analyse sous la forme : *X. euvesicatoria* pv. *allii* non détecté / détecté / détecté et identifié / détecté mais non identifié.

Le rapport devra par ailleurs faire mention de la technique de biologie moléculaire utilisée, selon la formulation suivante (ou une formulation équivalente).

-Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 038 - Détection de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation de la dN-PCR conventionnelle pour la détection et l'identification

-Méthode d'analyse utilisée : ANSES/LSV/MA 038 - Détection de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons par PCR et par isolement, suivie d'une identification, par PCR, des souches isolées – utilisation de la PCR temps réel pour la détection et l'identification

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

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LNR sous la référence RF-PJ/XEA01-V1-FR, juillet 2015.

Tableau 23: Synthèse des caractéristiques de performance de la méthode de détection de *Xea* sur parties végétatives d'Alliacées et sur semences d'oignons.

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou 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%	79 souches bactériennes cibles testées en duplicat (tableau 5* et annexe 5*) représentatives de la diversité géographique, génétique, d'une diversité de plantes hôtes et d'années d'isolement.
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	82%	115 souches bactériennes ou échantillons non-cibles testés en duplicat (tableau 6* et annexe 6*). Des défauts d'exclusivité sont observés sur des souches bactériennes proches génétiquement. Toutefois, la probabilité que les pathovars à l'origine de ces réactions croisées survivent sur plantes ou semences d'oignons est très faible car l'aptitude à produire des symptômes sur plantes d'oignons est spécifique de *Xea*. Aucun défaut d'exclusivité n'est rencontré sur saprophytes et autres phytopathogènes.
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	86%	79 souches bactériennes cibles testées en duplicat (tableau 5* et annexe 5*) et 115 souches bactériennes ou échantillons non-cibles testés en duplicat (tableau 6* et annexe 6*).
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel tous les résultats (100%) sont positifs	2.10^2 à 2.10^3 CFU.mL^{-1} pour les tests de biologie moléculaire	6 souches cibles (tableau 10*) en dopage dans de la matrice de semences d'oignons saines, 4 niveaux de concentration, 3 répétitions (à l'exception de la souche pathotype : 6 répétitions pour les niveaux 0 et 10^4 CFU.mL^{-1} et 12 répétitions pour les niveaux 10^2 et 10^3 CFU.mL^{-1}).
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre résultats interplaques pour les mêmes échantillons	100% pour les tests de biologie moléculaire à zéro contamination et au-delà de 2.10^3 CFU.mL^{-1}	6 souches cibles (tableau 10*) en dopage dans de la matrice de semences d'oignons saines, 4 niveaux de concentration, 3 répétitions (à l'exception de la souche pathotype : 6 répétitions pour les niveaux 0 et 10^4 CFU.mL^{-1} et 12 répétitions pour les niveaux 10^2 et 10^3 CFU.mL^{-1}).
Reproductibilité	Pourcentage d'accords entre résultats obtenus par deux laboratoires	100% pour les tests de biologie à zéro contamination et au-delà de 2.10^3 CFU.mL^{-1}	Test interlaboratoire comprenant 5 laboratoires différents portant sur 10 échantillons constitués d'extraits d'ADN de macérats de semences saines dopés ou non par des cibles ou non-cibles (8 cibles

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

Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
	différents pour les mêmes échantillons		dont une gamme à 5 points jusqu'à 10^3 CFU.mL^{-1}, 2 non-cibles) (tableau 17*).

** En référence au rapport de validation RF-PJ/XEA01-V1-FR, juillet 2015.*

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

Annexe 1 – Recette des tampons et milieux utilisés pour la détection de *Xea*

Tampon Tris 10mM :

Trizma Sigma 7-9 ® ($C_4H_{11}NO_3$): 1,2 g
Eau distillée : 1,0 L
pH = 7,2.

Stériliser par autoclavage.

Milieu LPGA :

Extrait de levure: 7,0 g
Bactopeptone: 7,0 g
Glucose: 7,0 g
Agar: 18,0 g
Eau distillée: 1,0 L
pH = 7,2.

A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2

Stériliser par autoclavage.

Remarque : Après autoclavage et avant de couler le milieu en cours de refroidissement mais encore en surfusion à une température ≤ 50°C, possibilité d'incorporer un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).

Milieu NCTM1:

Extrait de levure : 7,0 g
Bactopeptone : 7,0 g
Glucose : 7,0 g
Agar : 18,0 g
Eau distillée : 1,0 L
pH = 7,2.

A titre indicatif, l'ajout de 3ml de soude 1N par litre de milieu permet d'obtenir un pH d'environ 7,2.

Stériliser par autoclavage.
Après autoclavage et avant de couler le milieu, ajouter stérilement les antibiotiques et produits suivants à partir de solutions mères au milieu en cours de refroidissement (mais encore en surfusion à une température ≤ 50°C):
-Pivmécillinam : 100,0 mg (dissolution dans l'eau)
-Céphalexine : 30,0 mg (dissolution dans NaOH 1N)
Triméthoprime : 3,0 mg (dissolution dans l'éthanol 95%)
-Néomycine : 10,0 mg (dissolution dans l'eau)

Remarque : Possibilité d'incorporer en plus un antifongique (par exemple : cycloheximide à 50 mg/L ou propiconazole à 20 mg/L).

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

Bibliographie

1. **Bui Thi Ngoc, L., C. Vernière, E. Jouen, N. Ah-You, P. Lefeuvre, F. Chiroleu, L. Gagnevin, and O. Pruvost.** 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60:**515-525.

2. **EPPO.** PM7/128 (1) Diagnostic. *Xanthomonas axonopodis* pv. *alliii*. OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (3), 429-443.

3. **Gent, D. H., A. Al-Saadi, D. W. Gabriel, F. J. Louws, C. A. Ishimaru, and H. F. Schwartz.** 2005. Pathogenic and genetic relatedness among *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and other pathovars of *X. axonopodis*. Phytopathology **95:**918-925.

4. **Parkinson, N., C. Cowie, J. Heeney, and D. Stead.** 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59:**264-274.

5. **Rademaker, J. L. W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kersters, J. Swings, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. J. De Bruijn.** 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50:**665-677.

6. **Robène-Soustrade, I., D. Legrand, L. Gagnevin, F. Chiroleu, A. Laurent, and O. Pruvost.** 2010. Multiplex Nested PCR for Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. allii from Onion Seeds. Appl. Environ. Microbiol. **76:**2697-2703.

7. **Robène, I., M. Perret, E. Jouen, A. Escalon, M. Maillot, A. Chabirand, A. Moreau, A. Laurent, F. Chiroleu, and O. Pruvost.** 2015. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seed. J. Microbiol. Meth.

8. **Roumagnac, P., L. Gagnevin, L. Gardan, L. Sutra, C. Manceau, E. R. Dickstein, J. B. Jones, P. Rott, and O. Pruvost.** 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54:**15-24.

9. **Roumagnac, P., L. Gagnevin, and O. Pruvost.** 2000. Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. Eur. J. Plant Pathol. **106:**867-877.

10. **Roumagnac, P., O. Pruvost, F. Chiroleu, and G. Hughes.** 2004. Spatial and temporal analyses of bacterial blight of onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Phytopathology **94:**138-146.

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