**Méthode d'analyse en santé des végétaux**

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA055 - Version 6**

**Septembre 2026**

# Détection des souches tropicales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc TR4) par PCR en temps réel


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"



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.



ANSES/FGE/0139 [version e]
plan de classement PR3/ANSES/7

## 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 |
|---|---|---|---|
| v1 | | Juillet 2018 | Version initiale |
| v2 | majeures | Mars 2022 | - Précisions apportées dans l'introduction sur les souches de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ciblées par ce test.<br>- Mise à jour du mode opératoire, section « Préparation des échantillons pour analyse »<br>- Mise à jour du mode opératoire, section « Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total »<br>- Précision sur la durée de conservation des échantillons après prélèvement.<br>- Correction d'une erreur de libellé du test dans une des tables décisionnelles (Annexe. Table C) |
| v3 | mineures | Mars 2022 | - Précisions apportées dans le §1 concernant les variétés de bananiers pouvant être analysées par la méthode. |
| V4 | majeures | | - Changement du nombre de prises d'essai.<br>- Validation d'un nouveau kit PCR<br>- Reformulation d'une phrase, section « Préparation des échantillons pour analyse » |
| v5* | mineures | 2024 | - Modifications dans le tableau décisionnel<br>- Ajout du fournisseur d'oligonucléotides |
| v6 | majeure | 2026 | - Règle de positivité d'un échantillon<br>- Amélioration du texte pour apporter une plus grande clarté |

*La version 5 a fait l'objet d'une consultation du 12/11/2024 au 25/11/2024 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

*La version 6 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





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

# Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

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

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

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été initialement mise au point, optimisée et évaluée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (AGUAYO et al. 2017). Ce travail a bénéficié de la collaboration du laboratoire de pathologie des plantes de l'Université de Stellenbosch, en Afrique du Sud et de l'unité des ravageurs et agents pathogènes tropicaux du Laboratoire de la Santé des Végétaux, à la Réunion.



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

# Sommaire

**Avant-propos** ..... **3**
**Introduction** ..... **5**
**Avertissements et précautions de sécurité** ..... **6**
**1. Objet et domaine d'application** ..... **7**
**2. Documents de référence** ..... **7**
**3. Termes, sigles et définitions** ..... **7**
**4. Principe de la méthode** ..... **8**
**5. Réactifs** ..... **9**
5.1 Eau ..... 9
5.2 Kits d'extraction d'ADN ..... 9
5.3 Oligonucléotides ..... 10
5.4 Kit de PCR en temps réel ..... 10
5.5 Autres consommables à usage unique ..... 10
5.6 Contrôles et témoins ..... 10
**6. Appareillage et matériels** ..... **12**
**7. Échantillons** ..... **13**
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons ..... 13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse ..... 15
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse ..... 15
**8. Mode opératoire** ..... **16**
8.1 Préparation des échantillons pour analyse ..... 16
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total ..... 16
8.3 Test de détection par PCR en temps réel ..... 17
**9. Résultats** ..... **19**
9.1 Contrôle de la validité des résultats ..... 19
9.2 Calculs et expression des résultats ..... 20
**10. Caractéristiques de performance de la méthode** ..... **23**
**Bibliographie** ..... **29**



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

# Introduction

Le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) cause une maladie létale du bananier appelée ‘maladie de Panama’ ou ‘Jaunisse Fusarienne’. Le champignon comprend plusieurs races, pouvant infecter différents cultivars de bananier, mais ce sont les souches de la race tropicale 4 (Foc TR4) qui constituent la principale menace à la production de bananes dans le monde (Aguayo et al. 2017; Dita et al. 2010; Ordonez et al. 2015b). Les souches de Foc TR4 sont pathogènes sur plusieurs variétés de Bananier dans des conditions climatiques subtropicales et tropicales. Foc TR4 est notamment pathogène sur des cultivars de Cavendish, la variété la plus cultivée dans le monde. Les souches de Foc TR4 appartiennent à un groupe de compatibilité végétative (VCG), le VCG 01213/16, mais il a été aussi observé que des souches du VCG 0121 peuvent aussi être pathogènes sur la variété Cavendish en conditions tropicales (Aguayo et al. 2017; Carvalhais et al. 2019; Fraser-Smith et al. 2014). Deux isolats de Foc sont végétativement compatibles lorsque leurs hyphes sont capables de fusionner. Cette compatibilité végétative est la conséquence d’une proximité génétique relative.

**Ce test détecte indifféremment les VCG 01213/16 et 0121, regroupés dans cette méthode sous le terme de « souches tropicales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc TR4) » :**

- Le VCG 01213/16 est le responsable de la Jaunisse Fusarienne récemment observée hors de sa zone d’origine du Sud Est asiatique : en Afrique (Mozambique), en Asie (Pakistan, Jordanie, Israël et Inde), en Amérique du Sud (Colombie et Pérou) et dans l’Océan Indien (Mayotte) (Aguayo et al. 2020; Garcia-Bastidas et al. 2013; Garcia-Bastidas et al. 2020; Maymon et al. 2018; Ordonez et al. 2015a; Raman et al. 2019; Viljoen et al. 2020).
- Le VCG 0121, très proche génétiquement des souches du VCG 01213/16 (Aguayo et al. 2017; Groenwald et al. 2006; Ordonez et al. 2015b), est actuellement cantonné au Sud Est asiatique, mais pourrait potentiellement représenter un risque sanitaire pour les cultures de bananiers Cavendish hors de sa zone de distribution d’origine.



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

## 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-Alfort Cedex

# 1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de Foc TR4 dans un échantillon issu du pseudo-tronc des bananiers par le biais d'un test de détection par Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps-réel qui cible un gène codant pour une protéine impliquée dans la pathogénicité (LI et al. 2013).

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter Foc TR4 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 Foc TR4 ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

La méthode s'applique sur tissus végétatifs du pseudo-tronc de la variété Cavendish présentant des symptômes de fusariose. Néanmoins, tenant compte de la large gamme de cultivars de bananiers qui peuvent être infectés par Foc TR4, cette méthode est utilisable sur d'autres variétés présentant des symptômes de nécrose vasculaire.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse :

**L'échantillon préalablement séché doit être envoyé le plus rapidement possible au laboratoire d'analyse : le délai maximal d'envoi après prélèvement est de 2 mois.**

# 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

# 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, etc.).

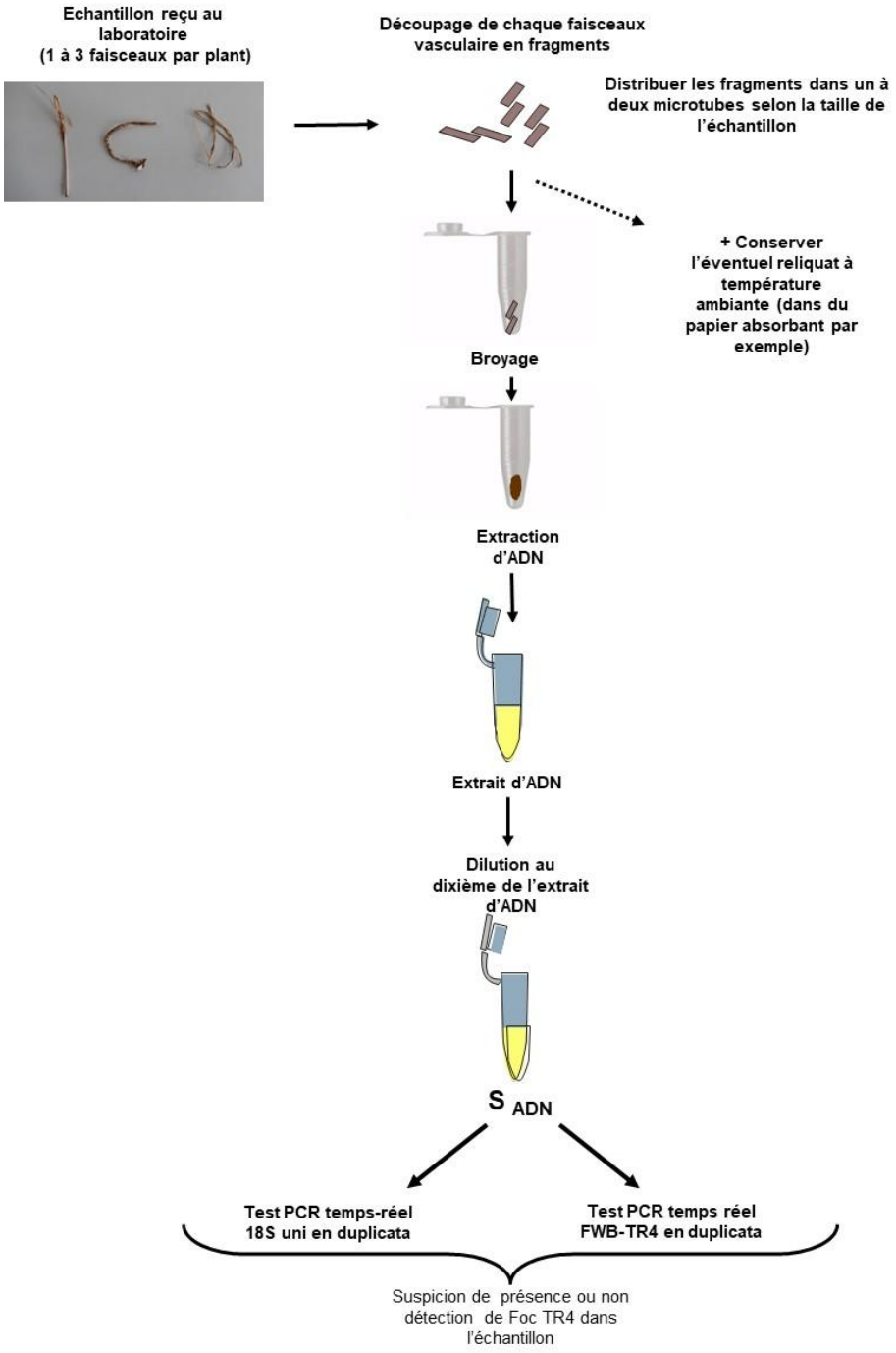
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



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

# 4. Principe de la méthode

**Figure n°1. Principe de la méthode**








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

# 5. Réactifs

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

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, 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 doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau de qualité « biologie moléculaire »). Prévoir de la glace pour l'étape d'extraction d'ADN (broyage des échantillons)

## 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 DNeasy plant mini kit (Qiagen) (Aguayo et al. 2017).



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

### 5.3 Oligonucléotides

**Tableau n° 1 : Oligonucléotides utilisés dans cette méthode**

| Cible | Nom | Séquence (5'-3') |
|---|---|---|
| Gène putatif de pathogénicité chez Foc TR4 (180 pb) | FWB-TR4 F[a] | CGGTCTCGGCCAAATCTGATT |
| | FWB-TR4 R[a] | ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG |
| | FWB-TR4 P[a] | **FAM-**ACCCTTCAACTCCACTCGATCGCA**-BHQ1** |
| ADNr 18S des plantes et champignons (150 pb) | 18S uni F[b] | GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA |
| | 18S uni R[b] | CCACCACCCATAGAATCAAGA |
| | 18S uni P[b] | **JOE**-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT**-BHQ1** |

[a] Aguayo et al, 2017; [b] Ioos et al., 2009

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

### 5.4 Kit de PCR en temps réel

Le kit validé pour cette méthode est le Takyon No Rox Probe Core Kit dTTP (Eurogentec).

### 5.5 Autres consommables à usage unique

- Pointes à filtre stériles de volume adaptés
- 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.
- Microtubes de lysing matrix A de 2 mL (MP Biomedicals).

### 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 :

- L'opérateur a correctement suivi le protocole,
- Les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- Les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- L'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),





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

- Qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont au minimum les suivants :

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur 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 (Ioos et al. 2009). 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 le test ciblant Foc TR4 ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test 18S uni sera réalisé dans une réaction distincte du test de détection Foc TR4. Une solution d'ADN ($S_{ADN}$) sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) généré par les deux réplicats est inférieur au Ctseuil 18S uni, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (échantillons issus du pseudo-tronc de *Musa* spp.) 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 23.5 (Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 009).**

- Un témoin négatif de processus ($T\text{-}_{PROC}$) ou un témoin négatif d'extraction ($T\text{-}_{extr}$) sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" (= "$T\text{-}_{extr}$"), c'est à dire un microtube vide de lysing matrix A de 2 mL stérile, 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 ($1^{er}$ type de faux positif). Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon issu des faisceaux du pseudo-tronc de bananier reconnu non contaminé par Foc TR4 (témoin négatif de processus, $T\text{-}_{PROC}$). L'un ou l'autre sera testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel FWB-TR4 F/-R/-P pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

- Un témoin positif ($T+_{18S\ Musa}$) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni -F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce $T+_{18S\ Musa}$ est constitué d'une solution d'ADN des faisceaux du pseudo-tronc de *Musa* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.

- Un témoin positif en limite pratique de détection ($T+_{LOD}$) sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel FWB-TR4 F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de Foc TR4 puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce $T+_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de Foc TR4 ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FWB-TR4 F/-R/-P. Ce $T+_{LOD}$ doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le





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

$T+_{LOD}$ a été ici défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.

- Un témoin négatif d'amplification (T- ou NTC, no template control) sera systématiquement introduit en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel FWB-TR4 F/-R/-P. 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 ($2^{eme}$ type de faux positifs).

Ces contrôles ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter si nécessaire sont définis par la MOA 022.

## 6. Appareillage et matériels

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

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022.

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

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 reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été caractérisée et validée sur un appareil Rotorgene-Q, Qiagen.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) 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).





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

# 7. Échantillons

## 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- Prélèvement et préparation des échantillons avant envoi pour analyse : Le prélèvement des échantillons est réalisé sur des plants symptomatiques[1,2] (présentant des symptômes de flétrissement vasculaire) en prélevant une section (« fenêtre ») de la partie inférieure du pseudo-tronc sur quelques centimètres de profondeur, jusqu'à atteindre la partie nécrosée (Figure n° 2). **A un plant de bananier symptomatique correspond un échantillon pour analyse**.

**Figure n°2. Section du pseudo-tronc découpé pour la recherche de Foc TR4**

La prise d'échantillon se réalise dans ce prélèvement à partir des sections nécrosées qui ne présentent pas un pourrissement trop avancé. Ces sections de tissus nécrosés peuvent être découpées à l'aide d'un couteau. A partir de ces sections, des faisceaux vasculaires nécrosés de quelques centimètres, peuvent être ensuite prélevés à l'aide d'un couteau (Figure n°3). Cette opération peut être réalisée sur site, ou de retour du terrain.

**Un à trois faisceaux vasculaires par plant sont suffisants**. Entre chaque plant échantillonné, désinfecter soigneusement les outils utilisés à l'alcool à 70% pour éviter une contamination de plants sains.

[1] https://www.sun.ac.za/english/faculty/agri/plant-pathology/ac4tr4/background/symptomatology-identification/symptomatology
[2] https://www.cabi.org/isc/datasheet/24621





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

**Figure n°3. Prélèvement de faisceaux vasculaires à partir d'une « fenêtre ».**

Une fois que le prélèvement d'échantillon est terminé, la « fenêtre » découpée (Figure n° 2) devra par la suite être recouverte de ruban adhésif pour éviter l'exposition des tissus infectés et des exsudats à l'environnement (Figure n°4).

**Figure n° 4. Fermeture de la « fenêtre » d'échantillonnage avec du ruban adhésif**

Au retour du terrain, pour chaque plant, placer aussitôt le(s) faisceau(x) vasculaire(s) entre deux couches de papier essuie-tout et les laisser sécher pendant 1 à 2 jours à température ambiante (Figure n°5).





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

**Figure n° 5. Aspect des faisceaux infectés après séchage.**

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : **L'échantillon pour analyse est constitué d'un à trois faisceaux vasculaires de *Musa* préalablement séchés** comme indiqué dans le point précédent (Figure n°5).

Confection du colis : L'envoi des échantillons au laboratoire d'analyse se fait par voie postale, en enveloppant chacun des échantillons secs dans du papier absorbant puis dans des sachets plastiques différenciés. Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine phytosanitaire » doit figurer à l'extérieur du colis.

Fiche de demande d'analyse : Inclure toutes les informations importantes sur l'échantillon à l'extérieur du colis en renseignant une fiche de demande d'analyse. Y inclure le maximum de renseignements pertinents : numéro de l'échantillon, date, nom du cultivar de banane, type de culture (plantation de bananier, jardin, etc.), localité (pays, région, ville, etc.), coordonnées GPS, nom du collecteur, toute autre information considérée comme importante. Cette fiche doit être placée à l'extérieur du colis.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

A la réception de l'échantillon et jusqu'à l'analyse, l'échantillon **préalablement séché peut être conservé à température ambiante avant analyse. La durée de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder trois mois.**

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité ; ici des faisceaux vasculaires séchés) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (ici à température ambiante, dans du papier filtre), 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. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat



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

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 est envoyé au laboratoire national de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, 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.

# 8. Mode opératoire

## 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. Chaque échantillon est traité individuellement. Les outils sont stérilisés (ex. : passés à la flamme puis refroidis) entre chaque échantillon.

Les prises d'essais s'effectuent sur des faisceaux vasculaires préalablement séchés (Figure n° 5) potentiellement infectés. Découper le ou les faisceaux de l'échantillon en petits fragments de 5 mm de longueur maximum. Le découpage est réalisé à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée. Les fragments sont ensuite mélangés.

Transférer un volume de fragments correspondant à environ 400 µL (mesurable dans un microtube gradué) dans un microtube de 2 mL de Lysing matrix A. Préparer un deuxième microtube si la taille de l'échantillon le permet.

A cette étape, le reste éventuel des fragments de l'ensemble des faisceaux sera conservé à température ambiante dans du papier filtre en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

A chaque échantillon (1 à 3 faisceaux vasculaires) reçu correspondra donc une prise d'essai de maximum 2 tubes, plus l'éventuel reliquat de fragments séchés conservé à température ambiante.

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

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre son homogénéisation et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. 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 les capuchons de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter 600 µL de tampon de lyse fourni par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage d'ADN au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois





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

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 1 minute à une fréquence d'agitation de 6 unités (m/s). Incuber chaque tube dans la glace pendant 5 minutes. Recommencer l'étape de broyage une deuxième fois.
5. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
6. Incuber chaque tube pendant environ 15 à 20 minutes à environ 65°C (ou à température préconisée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour re-homogénéiser son contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. Suivre ensuite le protocole d'extraction prescrit par le fabricant, après avoir brièvement centrifugé les tubes afin de limiter les risques de projection à leur ouverture.
8. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'élution (« Solution mère »), puis dilué au 1/10$^{e}$ dans du tampon d'élution. **Cette solution d'ADN total diluée au dixième constituera la solution d'ADN directement analysée par PCR en temps réel ($S_{ADN}$). La solution mère ainsi que la $S_{ADN}$ diluée au 10$^{ème}$ (= Solution mère diluée au 100$^{ème}$) pourront toutefois être analysées dans certains cas (Cf tables décisionnelles, § 9.2).**

## 8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection FWB - TR4

Le volume réactionnel est 20 µL : 18 µL de mélange réactionnel et 2 µL de $S_{ADN}$ à tester. La composition du mélange réactionnel est présentée dans la Tableau n°2.



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

**Tableau n° 2. Composition du mélange réactionnel pour la PCR en temps réel FWB - TR4**

| Composé | Concentration finale |
|---|---|
| Eau Ultra Pure | qsp 18 µL |
| Takyon No Rox Probe Core Kit dTTP (Eurogentec) | |
| Reaction Buffer | 1 X |
| Chlorure de Magnésium | 5 mM |
| dNTPs mix | 4 x 200 µM |
| Polymérase à DNA | 0.025 U/µL |
| Amorce sens FWB-TR4 F | 0.3 µM |
| Amorce antisens FWB-TR4 R | 0.3 µM |
| Sonde FWB-TR4 P | 0.1 µM |

1. Le mélange réactionnel 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 filtre stériles.
4. Le microtube contenant le mélange réactionnel complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mélange réactionnel est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µL par microtube.

Addition 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 *duplicata* (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 *duplicata* : $T-_{extr}$, $T+_{LOD}$, etc. Pour le T-, on substitue les 2 µL de $S_{ADN}$ par 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-Alfort Cedex

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel FWB-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de Foc TR4 sont présentés dans le Tableau n°3 (AGUAYO et al. 2017) :

**Tableau n° 3. Paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de Foc TR4**

| 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 | 10 sec | 40 |
| **3** | Hybridation - polymérisation | 60 °C | 45 sec puis mesure de la fluorescence FAM | |

* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

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

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel 18S uni

Ce test sera réalisé séparément du test de détection de Foc TR4. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de Foc TR4, en substituant simplement les amorces et la sonde FWB-TR4 F/R/P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P.

Les conditions d'amplification comprennent un cycle de dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN à 95 °C pendant 3 min, et 30 cycles avec une étape de dénaturation de l'ADN à 95 °C pendant 15 sec et une étape d'hybridation – polymérisation à 65 °C pendant 55 sec. Les extraits d'ADN sont testés en *duplicata*.

# 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.



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

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

- 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 $S_{ADN}$.

- 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 $S_{ADN}$.

- 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 Foc TR4.

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 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 réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct du contrôle $T+_{LOD}$ (= $Ct_{LOD}$). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à $Ct_{LOD}$ seront considérés comme positifs.

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des *n* prises d'essai sont analysés individuellement suivant les règles de décision présentées dans les tableaux 4 et 5. Sur la base de ces résultats le statut de l'échantillon est déterminé comme suit :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit qu'une des prises d'essai soit positive. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « Suspicion de présence de Foc TR4 dans l'échantillon analysé ». Dans le cadre d'analyses officielles, ce résultat est accompagné obligatoirement d'une mention précisant que « la présence définitive de Foc TR4 sera confirmée par la réalisation d'analyses complémentaires par le LNR ». L'envoi des reliquats d'analyse (reste de l'échantillon reçu par le laboratoire et non utilisé pour le test de détection par PCR en temps réel) au LNR est indiqué sur le rapport d'analyse.
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que l'ensemble des prises d'essai soient négatives. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « Foc TR4 non détecté dans l'échantillon analysé » en indiquant le seuil de détection.
- Un échantillon sera déclaré de statut indéterminé si une ou plusieurs des prises d'essai est de statut indéterminé et qu'aucune autre n'est positive. Le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé pour l'échantillon analysé », et il conviendra de mentionner dans les commentaires



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

la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

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 Foc TR4.
- 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.

Les règles décisionnelles à suivre pour la décision et l'expression des résultats sont indiquées dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 4** : PCR duplex Foc/18S Uni réalisée sur $S_{ADN}$

| **Test Foc** | | **Test 18S Uni** | | **Décision et résultat** |
|---|---|---|---|---|
| Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 | |
| **+** | **+** | ***n.a.** | **n.a.** | **Arrêt de l'analyse : Suspicion de présence FocTR4** |
| **-** | **-** | **+** | **+** | **Arrêt de l'analyse : FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode** |
| **-** | **-** | **-** | **-** | Refaire la PCR duplex Foc/18S Uni sur $S_{ADN}$ diluée au $10^{ème}$ et suivre le tableau 5 pour les règles décisionnelles |
| **+** | **-** | **+** | **-** | Refaire la PCR duplex Foc/18S Uni, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[3] devront être entreprises par le LNR |
| **+** | **-** | **+** | **+** | Refaire uniquement la PCR Foc en triplicat. A l'issue de ce test, si<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> Suspicion de présence FocTR4<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au $Ctmoy_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode |

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



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

**Tableau 5** : PCR duplex Foc/18S Uni réalisée sur $S_{ADN}$ diluée au 10ème (=solution mère diluée au 100ème)

| Test Foc | | Test 18S Uni | | Décision et résultat |
|---|---|---|---|---|
| Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 | |
| + | + | *n.a. | n.a. | **Arrêt de l'analyse : Suspicion de présence FocTR4** |
| - | - | + | + | **Arrêt de l'analyse : FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode** |
| - | - | - | - | Refaire la PCR duplex Foc/18S Uni sur la solution mère (suivre le tableau 6 pour les règles décisionnelles) |
| + | - | + | - | Refaire la PCR duplex Foc/18S Uni, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[3] devront être entreprises par le LNR |
| + | - | + | + | Refaire uniquement la PCR Foc en triplicat. A l'issue de ce test, si<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> Suspicion de présence FocTR4<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode |

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

**Tableau 6** : PCR duplex Foc/18S Uni réalisée sur Solution mère

| Test Foc | | Test 18S Uni | | Décision et résultat |
|---|---|---|---|---|
| Réplicat 1 | Réplicat 2 | Réplicat 1 | Réplicat 2 | |
| + | + | *n.a. | n.a. | **Arrêt de l'analyse : Suspicion de présence FocTR4** |
| - | - | + | + | **Arrêt de l'analyse : FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode** |
| - | - | - | - | Refaire une prise d'essai si l'échantillon le permet, sinon arrêt de l'analyse **: résultat indéterminé** |
| + | - | + | - | Refaire la PCR duplex Foc/18S Uni, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[4] devront être entreprises par le LNR |
| + | - | + | + | Refaire uniquement la PCR Foc en triplicat. A l'issue de ce test, si<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> Suspicion de présence FocTR4<br>▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse<br>=> FocTR4 non détecté au seuil de détection de la méthode |

[4] 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





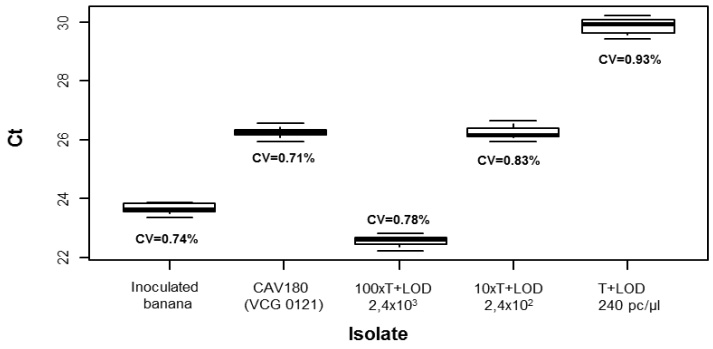
© Anses – 14, rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

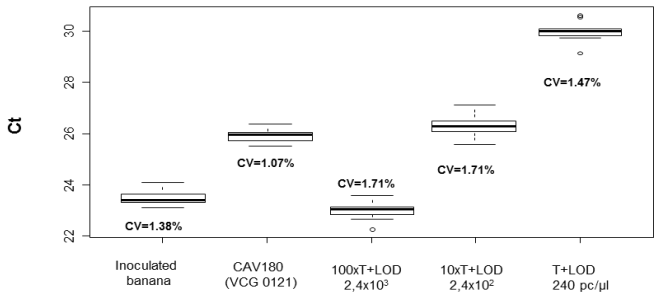
| Critère de performance | Résultats obtenus |
|---|---|
| **Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel** | Efficacité de réaction sur des solutions plasmidiques<br>- *Dilution dans du tampon TE 1X* : l'efficacité de réaction monoplex avec le Core kit No ROX (Eurogentec) a été évaluée à 0,91 ($R^2$= 0,99).<br>- *Dilution dans de l'ADN issu du pseudo-tronc de bananier* : l'efficacité de réaction monoplex avec le Core kit No ROX (Eurogentec) a été évaluée à 0,94 ($R^2$= 0,99) |
| **Sensibilité analytique** | La sensibilité analytique a été estimée à 47,4 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR (soit 23,7 cp/µL). Cette valeur correspond à la plus faible concentration produisant 100% de résultats positifs pour une réaction monoplex FWB-TR4 F/-R/-P avec dilution dans du TE 1X. Le Ct moyen, calculé pour la sensibilité analytique a été estimé à 29,61 ± 0,33 (moyenne ± écart-type).<br>La sensibilité analytique sur une gamme de dilution d'ADN génomique a été estimée à $1x10^{-3}$ ng/µL (Aguayo et al., 2017). |
| **Spécificité analytique** | La spécificité analytique du test a été évaluée *in vitro* avec succès sur un panel de 73 souches de Foc de races différentes (R1, R2 et STR4) et sur des espèces proches de Foc (63 souches). Aucune réaction croisée, ni de faux positifs ont été observés suite aux essais avec le test FWB- TR4 F/-R/-P. |
| **Inclusivité** | L'inclusivité a été démontrée *in vitro* sur des extraits d'ADN de souches de Foc TR4 provenant de 5 zones géographiques différentes (Taiwan, Indonésie, Australie, Malaisie, Philippines). Toutes les souches de Foc TR4 testées ont été détectées par le test, quelle que soit leur origine |
| **Répétabilité et reproductibilité** | La répétabilité a été évaluée sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations différentes, dont une proche de la limite de détection, sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de bananier artificiellement contaminé par le Foc TR4, et sur 10 réplicats d'ADN génomique d'un isolat de Foc TR4 (CAV 180, VCG 0121) en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).<br>Les coefficients de variation des Ct moyens obtenus pour la répétabilité ont été tous inférieurs à 1%. Ces résultats sont présentés dans la figure ci-dessous : |



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




La reproductibilité a été déterminée par l'analyse de 5 échantillons à différentes dates (5 runs). Ces échantillons sont les mêmes qu'utilisés pour le test de la répétabilité. Des coefficients de variation de Ct moyens inférieurs à 2% ont été obtenus pour tous les échantillons. La figure suivante représente ces résultats :




Le test est donc considéré répétable et reproductible.

**Robustesse**

La robustesse a été évaluée sur 3 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations différentes, dont une proche de la limite de détection, sur 3 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de bananier artificiellement contaminé par Foc TR4, sur 3 réplicats d'ADN génomique d'un isolat de Foc TR4 (CAV 180, VCG 0121) et sur 3 réplicats d'ADN génomique de 2 souches de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* des races 1 et STR4 ( LSVM 1000 et CAV 999) en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec) comme référence.

**Les paramètres évalués ont été les suivants :**

Kit réactionnel PCR en temps réel

Comparaison du Core kit No ROX vs mastermix qPCR No ROX

Comparaison des 2 kits par un test de T-Student

t = 0.40804, df = 27.475, p-value = 0.6864

Moyenne Ct groupe Core kit No ROX = 25,292

Moyenne Ct groupe mastermix qPCR No ROX = 25,664

**Conclusion : pas de différence significative des valeurs moyennes de Ct obtenu entre les deux kits réactionnels.**





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

| | |
|---|---|
| | Thermocycleur<br><br>Comparaison d'un Thermocycleur LightCycler® 480 System – Roche (système à bloc 96 puits) vs un Thermocycleur Rotorgene-Q, Qiagen (système à rotor 72 puits)<br><br>Comparaison des 2 thermocycleurs par un test de T-Student<br><br>t = 2.2761, df = 27.991, p-value = 0.03069<br><br>Moyenne Ct groupe thermocycleur Roche= 27.858<br><br>Moyenne Ct groupe thermocycleur Rotorgene=25.664<br><br>**Conclusion : un effet faible mais significatif du thermocycleur sur les valeurs moyennes de Ct est observé. L'utilisation de la machine Roche aurait un effet sur la sensibilité analytique du test, produisant des valeurs de Ct moyens plus élevées qu'avec la machine Rotorgene. Néanmoins, cette différence quantitative n'entraine pas de différence au niveau du résultat qualitatif obtenu (positif ou négatif) : la sensibilité et la spécificité du test pour la détection de Foc TR4 ne sont pas compromises. Tous les échantillons contaminés par Foc TR4 ont été jugés positifs et aucune réaction croisée, ni de faux positifs n'ont été observés suite aux essais avec le test FWB- TR4 F/-R/-P, quel que soit le thermocycleur utilisé.**<br><br>Variation de la quantité d'ADN template: 1,8 µl vs 2,0 µl<br><br>Comparaison des 2 quantités d'ADN par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br><br>W = 196.5, p-value = 0.9353<br><br>**Conclusion : pas d'effet significatif de la diminution de la quantité d'ADN template sur les valeurs moyennes de Ct.**<br><br>Variation de la quantité d'ADN template : 2,0 µl vs 2,2 µl<br><br>Comparaison des 2 quantités d'ADN par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br><br>W = 227, p-value = 0.4733<br><br>**Conclusion : pas d'effet significatif de l'augmentation de la quantité d'ADN sur les valeurs moyennes de Ct.**<br><br>Variation de la température d'hybridation : 58°C vs 60°C<br><br>Comparaison des 2 températures par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br><br>W = 111, p-value = 0.9674<br><br>**Conclusion : pas d'effet significatif de la diminution de la température sur les valeurs moyennes de Ct.**<br><br>Variation de la température d'hybridation : 60°C vs 62°C<br><br>Comparaison des 2 températures par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br><br>W = 143, p-value = 0.2133 |



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

| | |
|---|---|
| | **Conclusion : pas d'effet significatif d'augmentation de la température sur les valeurs moyennes de Ct.**<br><br>Variation de la quantité de mix (core kit) : 16 µl vs 18 µl (volume de consigne)<br>Comparaison des 2 quantités de mix par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br>W = 152.5, p-value = 0.2035<br>**Conclusion : pas d'effet significatif de la diminution la quantité de mix (et du volume réactionnel) sur les valeurs moyennes de Ct**<br><br>Variation de la quantité de mix (core kit) : 18 µl (volume de consigne) vs 20 µl<br>Comparaison des 2 quantités de mix par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br>W = 127, p-value = 0.04982<br>**Conclusion : pas d'effet significatif de l'augmentation de la quantité de mix (et du volume réactionnel) sur les valeurs moyennes de Ct**<br><br>Variation de la quantité de mix (core kit) : 16 µl vs 20 µl<br>Comparaison des 2 quantités de mix par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (test de la somme des rangs de Wilcoxon)<br>W = 114, p-value = 0.02067<br>**Conclusion : Un effet faible mais significatif du volume réactionnel sur les valeurs moyennes de Ct est observé. Néanmoins, cette différence quantitative n'entraine pas de différence au niveau du résultat qualitatif obtenu (positif ou négatif) : la sensibilité et la spécificité du test pour la détection de Foc TR4 ne sont pas compromises. Tous les échantillons contaminés par Foc TR4 ont été jugés positifs et aucune réaction croisée, ni de faux positifs n'ont été observés suite aux essais avec le test FWB- TR4 F/-R/-P** |
| **Autres critères :**<br>*Durée d'analyse* | Durée estimée de la méthode qPCR : environ 1 journée |
| **Autres critères :**<br>*Confirmation des positifs par analyses complémentaires* | Le test ici décrit a été conçu pour détecter Foc TR4. Comme décrit dans la littérature, les souches tropicales de Foc TR4 appartiennent à deux groupes de compatibilité végétative (VCG), les VGCs 01213/01216 et 0121. Ce test FWB-TR4 cible indistinctement tous les VCGs de la race tropicale 4 qui pourraient potentiellement représenter un risque sanitaire pour les cultures de bananiers. La littérature signale que le VCG 01213/01216 est particulièrement agressif et responsable des épidémies récentes observées en Afrique (Mozambique), en Asie (Pakistan, Jordanie, Israël et Inde), en Amérique du Sud (Colombie et Pérou) et dans l'Océan Indien (Mayotte).<br><br>Dans nos conditions de validation, la spécificité analytique et l'inclusivité du test FWB-TR4 ont été confirmées (AGUAYO et al. 2017). Cette évaluation a été réalisée sur un large panel de souches de *Fusarium oxysporum*. Néanmoins, il est impossible d'anticiper la présence ou l'apparition de souches qui n'appartiendraient pas au groupe Foc TR4 et qui génèreraient les faux positifs avec ce test, comme il l'a été observé en Australie pour un autre test moléculaire ciblant Foc TR4 (réaction croisée avec souches non pathogènes de Foc). Le complexe *F. oxysporum* est extrêmement riche à l'échelle planétaire, et de nombreux taxa restent probablement à décrire. Il est donc nécessaire de considérer ce test FWB-TR4 comme un test de criblage et de confirmer les résultats positifs obtenus (Suspicion de présence de Foc- TR4) par l'utilisation de techniques complémentaires. |





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

<table>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Autres critères :<br>Contrôle de la qualité d'extraction d'ADN</td><td>Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test PCR 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 23,5 sur une série de 136 valeurs de Ct. Ces valeurs ont été obtenues à partir de 136 prélèvements positifs de pseudo-tronc de bananiers avec le kit qPCR Corekit No ROX (Eurogentec) sur un appareil Rotorgene 6000 (Corbett Research).</td></tr>
<tr><td>Autres critères :<br>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.<br><br>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.<br><br>
<table>
<tr><th colspan="4">Validation des nouveaux critères de performance</th></tr>
<tr><td>Paramètre</td><td>Valeur obtenue</td><td>Valeur attendue</td><td>Décision / commentaire</td></tr>
<tr><td>Sensibilité analytique</td><td>10/10 T+LOD génèrent un Ct.</td><td>10/10 T+LOD génèrent un Ct.</td><td>Conforme</td></tr>
<tr><td>Inclusivité</td><td>Les 4 souches TR4 (dont une R4 VCG 0121) génèrent un Ct correct.</td><td>Les souches cibles génèrent un Ct.</td><td>Conforme</td></tr>
<tr><td>Spécificité analytique</td><td>Les 3 souches de Foc autre que TR4 ne génèrent pas de Ct</td><td>Les souches non cibles ne génèrent pas de Ct.</td><td>Conforme</td></tr>
<tr><td>Répétabilité</td><td>10/10 T+cal génèrent un Ct = 22.97 ± 0.85.</td><td>10/10 T+cal génèrent un Ct ≈23.</td><td>Conforme</td></tr>
<tr><td>Sensibilité / Spécificité relative</td><td>Les 3 échantillons positifs génèrent un Ct ≈ 24-25.<br>Les échantillons négatifs ne génèrent pas de Ct.</td><td>Les échantillons positifs doivent générer un Ct ≈ Ct générés avec l'ancien Core Kit (Ct ≈ 24-25).<br>Les échantillons négatifs ne génèrent pas de CT.</td><td>Conforme</td></tr>
<tr><td>Comparaison CT 18S-Uni</td><td>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</td><td>Les Ct générés avec le test 18S-Uni sur des échantillons doivent être inférieur au Ct seuil.</td><td>Conforme</td></tr>
</table>
<br>Tous ces paramètres sont conformes et donnent des valeurs équivalentes à celles générées par le kit qPCR Corekit No ROX (Eurogentec).</td></tr>
<tr><td>Autres critères :<br>Changement du nombre de prises d'essai</td><td>En l'absence de symptômes et sans recul sur la méthode, il avait été décidé, lorsque c'était possible, de prélever et analyser jusqu'à trois prises d'essai pour chaque échantillon afin de maximiser les chances de détecter le parasite.<br><br>La méthode étant maintenant utilisée en routine depuis plusieurs années et ayant permis de mettre en évidence plusieurs dizaines d'échantillons positifs, nous avons vérifié que pour 100% des échantillons analysés jusqu'à présent, les 3 prises d'essai donnent un résultat concordant en terme d'absence/présence du champignon.<br><br>Pour cette raison, il a été décidé de réduire le nombre de prises d'essai de trois à deux pour chaque échantillon.</td></tr>
</table>



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

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

# Bibliographie

- AGUAYO, J.; D. MOSTERT; C. FOURRIER-JEANDEL; I. CERF-WENDLING; B. HOSTACHY; A. VILJOEN; R. IOOS, 2017: Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. PloS one, 12, e0171767.

- AGUAYO, J.; I. CERF-WENDLING; A. B. FOLSCHER; C. FOURRIER-JEANDEL; R. IOOS; M. C. MATHEWS; D. MOSTERT; C. RENAULT; V. WILSON; A. VILJOEN, 2020: First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4) Causing Banana Wilt in the Island of Mayotte. Plant Disease, 0, PDIS-06-20-1196-PDN.

- CARVALHAIS, L. C.; J. HENDERSON; V. A. RINCON-FLOREZ; C. O'DWYER; E. CZISLOWSKI; E. A. B. AITKEN; A. DRENTH, 2019: Molecular Diagnostics of Banana Fusarium Wilt Targeting Secreted-in-Xylem Genes. Frontiers in Plant Science, 10.

- DITA, M. A.; C. WAALWIJK; I. W. BUDDENHAGEN; M. T. SOUZA JR; G. H. J. KEMA, 2010: A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. Plant Pathology, 59, 348-357.

- FRASER-SMITH, S.; E. CZISLOWSKI; R. A. MELDRUM; M. ZANDER; W. O'NEILL; G. R. BALALI; E. A. B. AITKEN, 2014: Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plant Pathology, 63, 1044-1052.

- GARCÍA-BASTIDAS, F.; N. ORDÓÑEZ; J. KONKOL; M. AL-QASIM; Z. NASER; M. ABDELWALI; N. SALEM; C. WAALWIJK; R. C. PLOETZ; G. H. J. KEMA, 2013: First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 Associated with Panama Disease of Banana outside Southeast Asia. Plant Disease, 98, 694-694.

- GARCIA-BASTIDAS, F. A.; J. C. QUINTERO-VARGAS; M. AYALA-VASQUEZ; T. SCHERMER; M. F. SEIDL; M. SANTOS-PAIVA; A. M. NOGUERA; C. AGUILERA-GALVEZ; A. WITTENBERG; R. HOFSTEDE; A. SØRENSEN; G. H. J. KEMA, 2020: First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. Plant Disease, 104, 994-994.

- GROENEWALD, S.; N. VAN DEN BERG; W. F. O. MARASAS; A. VILJOEN, 2006: Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Australasian Plant Pathol., 35, 401-409.

- IOOS, R.; C. FOURRIER; G. IANCU; T. R. GORDON, 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.

- LI, M.; J. SHI; X. XIE; Y. LENG; H. WANG; P. XI; J. ZHOU; S. ZHONG; Z. JIANG, 2013: Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. Canadian Journal of Plant Pathology, 35, 482-493.

- MAYMON, M.; U. SHPATZ; Y. M. HAREL; E. LEVY; G. ELKIND; E. TEVEROVSKY; R. GOFMAN; A. HABERMAN; R. ZEMORSKI; N. EZRA; Y. LEVI; G. OR; N. GALPAZ; Y. ISRAELI; S. FREEMAN, 2018: First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 Causing Fusarium Wilt of Cavendish Bananas in Israel. Plant Disease, 102, 2655.

- ORDONEZ, N.; F. A. GARCIA; H. LAGHARI; M. AKKARY; E. N. HARFOUCHE; B. N. AL AWAR; G. H. J. KEMA, 2015a: First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. Plant Disease.

- ORDONEZ, N.; M. F. SEIDL; C. WAALWIJK; A. DRENTH; A. KILIAN; B. P. H. J. THOMMA; R. C. PLOETZ; G. H. J. KEMA, 2015b: Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. PLoS pathogens, 11, e1005197.

- RAMAN, T.; D. MOSTERT; M. GOPI; P. DEVI; P. BALAKRISHNAN; A. MOLINA; A. VILJOEN, 2019: First detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (TR4) on Cavendish banana in India. European Journal of Plant Pathology, 154.



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

- VILJOEN, A.; D. MOSTERT; T. CHICONELA; I. BEUKES; C. FRASER; J. DWYER; H. MURRAY; J. AMISSE; E. L. MATABUANA; G. TAZAN, 2020: Occurrence and spread of the banana fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 in Mozambique. South African Journal of Science, 116.





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