

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA081- Version 01

Juillet 2025

# Détection de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* dans un échantillon de sol par PCR temps réel

Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de nématologie

Laboratoire national de référence « nématodes phytopathogènes\*»

\*tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel désignant les laboratoires nationaux de référence en vigueur dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

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  |
|------------------------------------|--|--------------------------|--|
| MOA 024 partie A (version1a et 1b) |  | Avril 2012- Mars 2013    |  |
| MOA 024 partie A version 1b        | mineures                                   | Mars 2013 – juillet 2025 | Sans objet _ Amélioration formelles et précisions utiles aux utilisateurs  |
| ANSES/LSV/MA081                    | majeures                                   | 07/2025                  | <p>Mise au nouveau format de méthode<br/> Mise à jour des documents de référence<br/> Modifications à l'étape d'extraction :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- volume de sol analysé passe de 300mL à 200mL</li> <li>- optimisation du mode opératoire lors de l'éluviation</li> </ul> <p>Ajout d'un autre modèle d'automate d'extraction d'ADN et possibilité d'utiliser d'autres automates d'extraction d'ADN dès lors que les résultats obtenus sont équivalents<br/> Quelques modifications mineures : vitesse de centrifugation élargie à entre 10000 et 15000g au lieu de 12000g environ.</p> |

\* La version 01 a fait l'objet d'une consultation du 17/06/2025 au 16/07/2025 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

## Avant-propos

La présente méthode a été optimisée et validée par :

**Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Nématologie**

Laboratoire National de Référence : « nématodes phytopathogènes\*»

\* tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte  
BP 35327  
35653 LE RHEU Cedex  
France

Contact : [rennes.lsv@anses.fr](mailto:rennes.lsv@anses.fr)

# Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1. Objet et domaine d'application .....</b>                               | <b>7</b>  |
| <b>2. Documents de référence .....</b>                                       | <b>8</b>  |
| <b>3. Termes, sigles et définitions .....</b>                                | <b>8</b>  |
| <b>4. Principe de la méthode.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>5. Consommables et réactif .....</b>                                      | <b>10</b> |
| 5.1 Extraction .....   | 10        |
| 5.2 Analyses moléculaires .....  | 10        |
| <b>6. Appareillage et matériels.....</b>                                     | <b>11</b> |
| 6.1 Extraction .....   | 11        |
| 6.2 Calibration de l'éluatriceur .....                                       | 12        |
| 6.3 Entretien de l'éluatriceur.....  | 12        |
| 6.4 Mode d'emploi de l'éluatriceur.....                                      | 12        |
| 6.5 Analyse moléculaire .....  | 13        |
| <b>7. Contrôles et témoins .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>8. Échantillons .....</b>   | <b>15</b> |
| 8.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....                          | 15        |
| 8.2 Conservation des échantillons avant analyse .....                        | 15        |
| 8.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....            | 15        |
| <b>9. Mode opératoire .....</b>  | <b>15</b> |
| 9.1 Extraction des nématodes à partir du sol par élutriation .....           | 15        |
| 9.1.1 Préparation des échantillons pour analyse .....                        | 15        |
| 9.1.2 Mise en solution .....   | 16        |
| 9.1.3 Stratification par élutriation.....                                    | 16        |
| 9.1.4 Récupération par filtration .....                                      | 16        |
| 9.1.5 Centrifugation.....  | 17        |
| 9.1.6 Récupération et conditionnement.....                                   | 17        |
| 9.1.7 Conditionnement de l'extrait, prises d'essai pour extraction ADN ..... | 18        |
| 9.2 Extraction d'ADN .....   | 18        |
| 9.3 Détection par PCR temps réel .....                                       | 439       |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>9.4 Résultats .....</b>   | <b>21</b> |
| 9.4.1 Validation de l'analyse avec TIA.....                                      | 22        |
| 9.4.2 Interprétation de l'analyse avec TIA .....                                 | 22        |
| 9.4.3 Validation des résultats de l'analyse sans TIA.....                        | 23        |
| 9.4.4 Interprétation des résultats de l'analyse sans TIA .....                   | 24        |
| <b>10. Formulation des résultats .....</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>11. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>                    | <b>25</b> |
| 11.1 Extraction des nématodes à partir d'un sol .....                            | 25        |
| 11.2 Analyses moléculaires .....   | 26        |
| <b>Bibliographie.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>Annexes.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>Annexe 1 : Calibration de l'éluviateur.....</b>                               | <b>27</b> |
| <b>Annexe 2 : Script du programme de l'automate KingFisher mL.....</b>           | <b>28</b> |
| <b>(pour le MagnetaPure 32 Plus (Nacherey Nagel), se rapprocher du LNR).....</b> | <b>28</b> |

## Introduction

Les « nématodes à galles » du genre *Meloidogyne* sont des nématodes phytoparasites très polyphages. Les stades mobiles de ce genre susceptibles d'être présents dans les sols sont les larves infectieuses du second stade et les mâles. Les larves du second stade pénètrent dans les racines de leurs plantes-hôtes et deviennent alors sédentaires. Elles se développent jusqu'au stade adulte en s'alimentant aux dépends de leur plante-hôte en modifiant la taille des cellules avoisinantes pour créer un site nourricier, provoquant ainsi une déformation de la racine appelée galle. Les nématodes à galles peuvent causer d'importantes altérations du système racinaire dont les conséquences pour la plante sont une diminution de la croissance végétale, des jaunissements, des flétrissements entraînant une baisse de rendement et de qualité des productions.

*M. chitwoodi* et *M. fallax* sont présents en Europe et sont considérés comme des espèces de nématodes les plus nuisibles en milieu agricole dans cette région en raison de leurs larges gammes d'hôtes (KarsSEN, 2002) composées de nombreuses familles végétales (den Nijs et al., 2004). Leurs gammes d'hôtes incluent notamment les légumes-racines et beaucoup de plantes cultivées de la famille des solanacées, en particulier la tomate.

## 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 exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

## 1. Objet et domaine d'application

### Objet

La méthode décrite ici permet de détecter les formes libres (larves de stade 2 ou L<sub>2</sub> et mâles) des nématodes des espèces *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* à partir d'un sol ou d'un produit terreux. L'extraction par élutriation de ces organismes est basée sur une technique de flottaison des nématodes par courant ascendant. La détection des individus des espèces *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* est basée sur une extraction de l'ADN total de l'extrait suivie de PCR temps réel ciblant ces deux nématodes.

### Domaine d'application

#### **Objets susceptibles d'être soumis à analyse**

Les échantillons analysés par le laboratoire sont des sols ou produits terreux pouvant contenir des larves ou des mâles de *Meloidogyne* spp..

Cette présente technique a été développée pour extraire les nématodes libres d'un sol ou produit terreux mais n'est pas adaptée à des substrats composés uniquement de matières organiques légères.

#### **Grandeur de l'objet soumis à l'analyse**

La taille de l'échantillon analysé par cette méthode n'est pas critique. L'analyse d'un échantillon est réalisée sur une prise d'essai (cf. point 9.1.1) d'un volume d'environ 200 mL lorsque la taille initiale de l'échantillon le permet. A défaut, l'analyse est réalisée sur l'intégralité de l'échantillon et le rapport d'analyse indiquera que le volume analysé est inférieur à 200 mL.

#### **Précautions particulières à prendre**

Il est recommandé d'analyser l'échantillon dans un délai d'environ 45 jours entre la réception et le début effectif de l'extraction. L'échantillon de sol devra pendant ce temps être conservé à température ambiante et de préférence dans un endroit frais. Les prises d'essai en microtubes (culots pour extraction d'ADN), comme les solutions d'extraits ADN (S<sub>ADN</sub>) peuvent être conservées congelées avant analyse sans en altérer la qualité.

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, équipements, etc.) visant à éviter tout risque de contamination d'un échantillon par un autre et de dissémination dans l'environnement.

## 2. Documents de référence

| Référence                                     | Titre  |
|---|--|
| <b>ANSES/LSV/MA077</b>                        | Détection morphologique de nématodes à galles ( <i>Meloidogyne spp.</i> ) à partir de sol  |
| <b>Directive (UE) n° 2019/523 du 21/03/19</b> | Directive (UE) n° 2019/523 du 21/03/19 modifiant les annexes I à V de la directive 2000/29/CE du Conseil concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté (JOUE n° L 86 du 28 mars 2019) |
| <b>MOA 022</b>                                | 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 d'éviter toute mauvaise 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...).

Termes ou sigles pouvant être rencontrés dans le texte :

Forme libre : nématode filiforme ayant une capacité de déplacement

L<sub>2</sub> : larves de second stade

## 4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est décrit dans le logigramme ci-dessous :

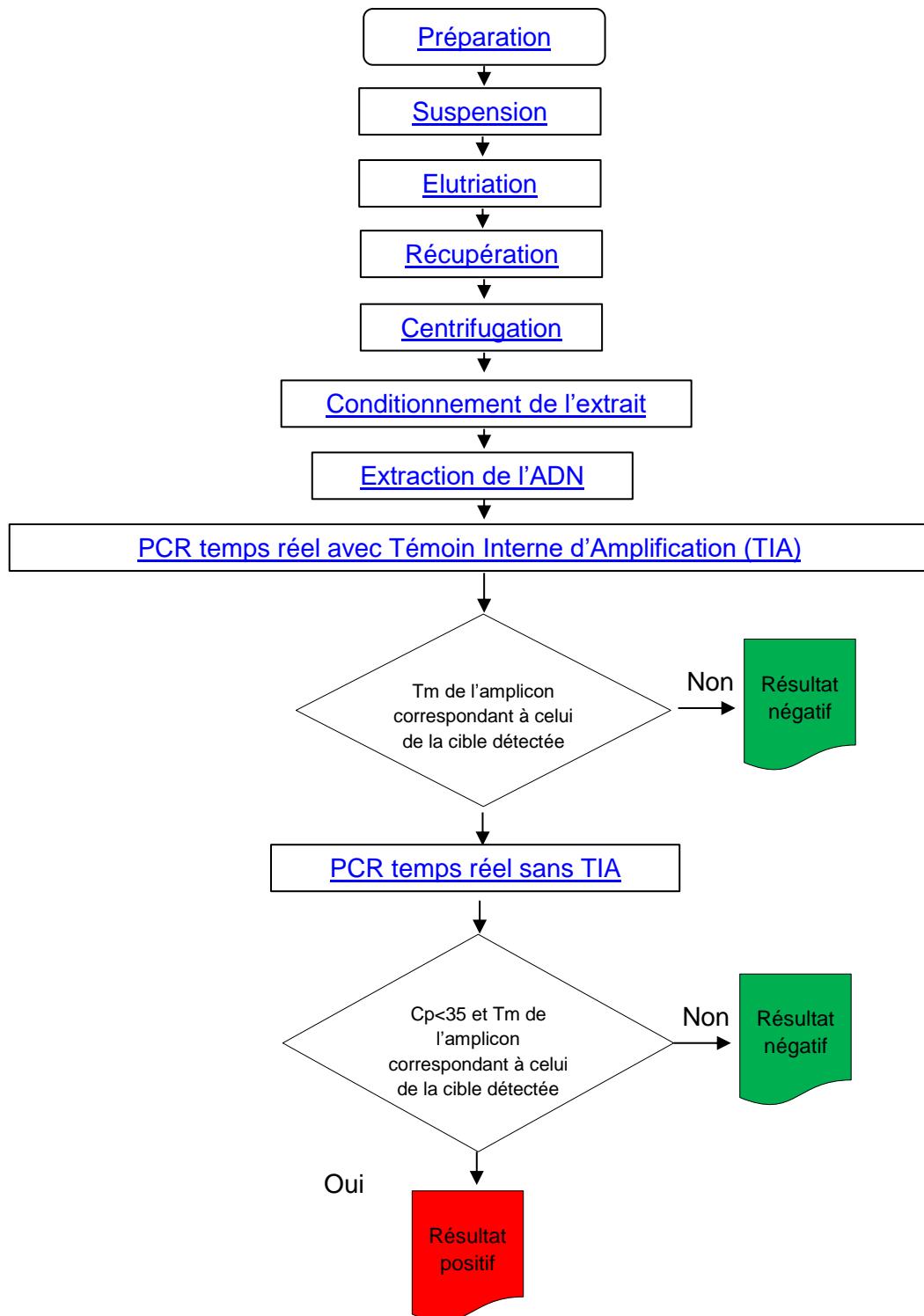


Figure 1 : Logigramme de la méthode

## 5. Consommables et réactif

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés 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.

### 5.1 Extraction

- Eau
- Solution de sulfate de Magnésium MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (densité d'environ 1,18) ou solution à propriété équivalente
- Kaolin
- Récipients pour conditionnement des extraits, et notamment tubes à fond conique

### 5.2 Analyses moléculaires

Le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer avec le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, sont suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définit les conditions qu'il juge les plus optimales.

- Kit d'extraction d'ADN. Le kit utilisé pour la validation de la méthode est le kit *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega réf. FF3750 et FF3751).

Tout autre kit, protocole d'extraction d'ADN ou automate peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN ou l'automate préconisé. En l'occurrence, le laboratoire doit apporter la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

- Oligonucléotides

Les séquences des amorces utilisées ne sont pas publiées, mais les solutions prêtées à l'emploi peuvent être commandées auprès de la société *Clear®Detections*.

<http://www.cleardetections.com/en>

- Master Mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode (au minimum, vérifier la sensibilité et la spécificité), voir § 6.5.

- Autres consommables à usage unique : micro-billes de verre, de métal ou de céramique de 1 mm et 3 mm de diamètre.

## 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. 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.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode officielle d'analyse MOA 022. Différents systèmes peuvent être utilisés, en fonction de l'appareillage disponible au laboratoire. Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Tableau 1 : Grandeurs et EMT associées selon MOA022

| Grandeur    | EMT ou valeur seuil  |
|-------------|--|
| Volume      | Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ ou EMT normes ISO 8655   |
| Température | <b>réfrigérateur</b> : $5^\circ\text{C}$ et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur)<br><b>congélateur</b> : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction de l'usage<br><b>thermocycleur*</b> : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$ ; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$ |

\*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 Extraction

- Elutriateur d'Oostenbrink transparent de 8 L de volume utile (cf. point 6.3)
- Appareil permettant de créer une boue fluide (ex : agitateur à retournement, malaxeur, ...)
- Pissettes
- Récipients avec couvercle pour agitation
- Tamis de récupération de mailles 40 µm et 20 µm
- Tamis de criblage de mailles d'environ 1 mm et d'environ 4 mm
- Centrifugeuse
- Récipients de centrifugation d'une capacité adaptée au volume des récupérations
- Balance ou autre équipement permettant un équilibrage des récipients de centrifugation
- Cuillère, spatule, fouet ou autre système d'homogénéisation (vibreur...)

## 6.2 Calibration de l'éluviateur

Cette méthode a été optimisée et validée avec l'éluviateur d'Oostenbrink en plexiglass de marque Meku modèle 9.0251 (dimensions L:450 mm x P:450 mm x H:1100 mm). Un calibrage de cet appareil est nécessaire pour mettre en œuvre la présente méthode et est décrit en [annexe 1](#). L'utilisation d'un autre modèle d'éluviateur est possible mais nécessite que le laboratoire utilisateur effectue une validation préalable pour vérifier qu'il obtient un taux d'extraction similaire.

## 6.3 Entretien de l'éluviateur

L'éluviateur nécessite un entretien régulier afin de garantir son bon fonctionnement et il est notamment nécessaire de s'assurer que :

- les parois internes soient propres et lisses,
- les trous d'arrivée d'eau dans la zone de décantation (6) ne soient pas obstrués (schématisés avec des flèches dans la Figure 2) et le cas échéant les déboucher,
- le débitmètre soit propre et fonctionnel (pas de dépôt qui limite les déplacements du flotteur) et d'enrassement à la sortie du débitmètre.

## 6.4 Mode d'emploi de l'éluviateur

Un mode d'emploi constructeur est fourni avec l'appareil lors de son achat. Ce mode d'emploi constructeur est en partie adapté et modifié dans cette méthode. Pour les besoins analytiques spécifiques liés à cette méthode d'analyse, celle-ci se substitue au mode d'emploi fourni par le constructeur.

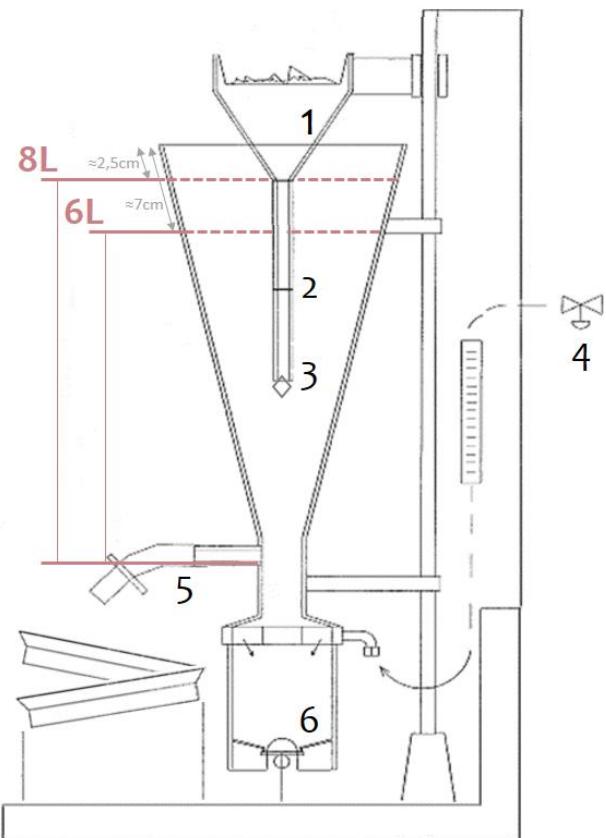


Figure 2 : Schéma de l'éluviateur

## 6.5 Analyse moléculaire

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

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent,
- Automate pour la purification d'ADN, dont la technologie est basée sur la séparation par capture magnétique (par exemple les systèmes KingFisher®, Magneta ou MagBinder). Tout autre kit ou automate peut être utilisé dès lors qu'il permet d'obtenir les mêmes résultats que ceux obtenus lors de la validation de la méthode (§11.2).
- Appareil de PCR en temps réel.

Les matériels et consommables utilisés pour la mise au point et la validation de cette méthode étaient :

- l'automate KingFisher® mL (Thermo Fisher Scientific) pour l'extraction d'ADN,
- les thermocycleurs :
  - *LightCycler 2.0 Roche* (capillaires verre), avec des consommables du même fournisseur et notamment le master mix *LightCycler® FastStartDNA MasterSYBR Green I*
  - *Lightcycler 480 Roche* (plaqué 96), avec des consommables du même fournisseur et notamment le master mix *LightCycler® 480 SYBR Green I Master*.

Au cours de la validation, d'autres couples thermocycleur/pré-mix commercial ont également été testés et ont produit des résultats de statut équivalent (détecté – non détecté) :

- *Corbett Rotorgene 6000 / Mastermix Mesagreen (Eurogentec)*
- *ABI 7500 / Power SYBRGreen PCR master mix (ABI)*
- *Stratagene Mx3005P /QuantiTect SYBRGreen PCR (QIAGEN)*.

D'autres essais ont été réalisés avec l'automate de purification d'acides nucléiques MagnetaPure 32 Plus (Macherey Nagel ou Dutscher) et donnent des résultats équivalents en sensibilité (script du programme disponible auprès du LNR).

## 7. Contrôles et témoins

Des échantillons et/ou des extraits d'échantillon doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode.

Il est recommandé d'introduire des échantillons de sol indemne de *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* dans la chaîne d'analyse pour l'ensemble de la méthode. La fréquence d'introduction peut être par exemple : tous les 20 échantillons, entre chaque lot d'échantillons (groupe d'échantillons provenant d'une même parcelle) ou par journée de travail.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse moléculaire (extraction d'ADN et PCR temps réel) sont au minimum les suivants :

- Un témoin négatif de processus (T-proc) sera utilisé dans chaque série d'extraction d'ADN. Ce peut être un extrait de sol non contaminé par *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* (il peut éventuellement contenir d'autres nématodes) ou bien un tube vide qui sera traité à partir de l'étape d'extraction d'ADN dans les mêmes conditions que les extraits de sol à analyser. Ce témoin permettra de vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons, ou de contamination externe, lors de cette phase de l'analyse.
- Un témoin positif de processus (= T+proc) sera utilisé dans chaque série d'extraction d'ADN. Ce peut être un extrait de sol contaminé par *Meloidogyne chitwoodi* et/ou *M. fallax* à un niveau proche du seuil de la méthode ou légèrement au-dessus. Il peut être fourni par le LNR. L'extraction d'ADN est réalisée dans les mêmes conditions que les autres extraits de sol. Ce témoin permettra de vérifier l'absence d'anomalie majeure au cours de cette phase de l'analyse.
- Un témoin interne d'amplification (= TIA ou contrôle de la présence d'inhibiteur) sera utilisé pour chaque puits PCR. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel visant à détecter un fragment d'ADN plasmidique cible (fourni sur demande par le LNR) ajouté dans le mix de la PCR. Il sera donc utilisé dans la même réaction, détecté par le même couple d'amorces, mais la taille, et par conséquent le point de température de fusion des fragments amplifiés (ou *melting temperature =Tm*) sont différents.
- Un témoin négatif de PCR (T- PCR ou NTC pour No Template Control) sera systématiquement introduit lors de chaque manipulation. Il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais une prise d'échantillon « eau » est ajoutée pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase de préparation du mélange réactionnel ou bien lors de l'ajout des solutions ADN ( $S_{ADN}$ ).
- Un témoin positif de PCR (= T+ PCR) sera systématiquement introduit lors de chaque manipulation sans T+proc; dans le cas contraire son utilisation est facultative. Il contient tous les éléments du mélange réactionnel auxquels est ajoutée une solution ADN (=  $S_{ADN}$ ) contenant la cible.

Les témoins à mettre en œuvre selon le test PCR réalisé sont résumés dans le tableau 2. Ces contrôles, ainsi que des contrôles supplémentaires que le laboratoire peut ajouter s'il le juge nécessaire, sont définis par la MOA 22.

Certains des témoins mentionnés dans cette méthode sont constitués de cibles d'ADN clonés dans des plasmides bactériens. Ils peuvent être conservés plusieurs mois congelés.

Tableau 2 : Témoins à inclure selon le test PCR

| Test PCR avec TIA | TIA         | T- proc     | T+ proc     | NTC         | T+ PCR      |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                   | obligatoire | obligatoire | obligatoire | obligatoire | facultatif  |
| Test PCR sans TIA | sans objet  | facultatif  | facultatif  | obligatoire | obligatoire |

## 8. Échantillons

### 8.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que l'analyse puisse être réalisée, l'échantillon doit avoir été conditionné par l'expéditeur dans un sachet ou un récipient fermé et référencé.

### 8.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant extraction, les échantillons et prises d'essai sont conservés à température ambiante et de préférence dans un endroit frais.

Après extraction et avant détection, les solutions d'extraits de sol sont conservées au réfrigérateur.

Les prises d'essais en microtubes (culots à partir des solutions d'extraits de sol pour extraction d'ADN) comme les solutions d'extraits ADN ( $S_{ADN}$ ), peuvent être conservées congelées avant analyse sans en altérer la qualité.

### 8.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Il n'y a pas d'exigence particulière concernant la conservation des reliquats d'échantillon, mais il est recommandé de les conserver dans un endroit frais.

Dans le cadre d'un plan de surveillance, si un résultat positif est obtenu pour l'une ou l'autre des deux cibles, l'ADN extrait ainsi que le reliquat d'échantillon de sol sont adressés au LNR qui réalisera une analyse de confirmation.

## 9. Mode opératoire

### 9.1 Extraction des nématodes à partir du sol par élutriation

#### 9.1.1 Préparation des échantillons pour analyse

Un volume de sol d'environ 200 mL constitue la prise d'essai à analyser par échantillon après préparation. Cette préparation nécessite l'élimination des débris de végétaux et cailloux qui pourraient impacter le volume final de la prise d'essai (l'élimination peut se faire manuellement ou par tamisage sur un tamis de criblage de 4 mm). Si possible, la prise d'essai est constituée de plusieurs prises élémentaires, en ayant au préalable homogénéisé le sol et cassé d'éventuels agrégats.

*Remarque : les débris végétaux et cailloux sont éliminés et traités de façon appropriée pour éviter tout risque de dissémination des nématodes dans l'environnement.*

### 9.1.2 Mise en solution

L'objectif de cette étape est d'obtenir une boue fluide. Pour cela, s'ils permettent d'atteindre le même objectif, plusieurs type d'appareils peuvent être utilisés (agitateur à retournement, malaxeur, ...). Il est important de prévenir tout risque de contamination entre les prises d'essai lors de cette étape.

*Exemple de l'utilisation d'un agitateur à retournement : les prises d'essais sont conditionnées dans des pots d'environ 400 mL pouvant être fermés hermétiquement. Le sol est largement recouvert d'eau tout en conservant une partie du pot avec un volume d'air. Les pots, fermés hermétiquement, sont ensuite placés dans l'agitateur à vitesse faible pour une durée d'agitation permettant l'obtention de la boue fluide.*

A noter que, quel que soit l'appareil utilisé, la durée pour obtenir une boue fluide est dépendante de la texture du sol. Par exemple, une prise d'essai issue d'un sol sableux sera plus facilement transformée en boue fluide que celle issue d'un sol argileux.

### 9.1.3 Stratification par élutriation

- S'assurer que l'élutriateur est fermé au niveau du tuyau de vidange (Figure 2 : 5) et s'assurer également que la zone de décantation (6) est bien fermée (exemple : en y mettant un fond d'eau).
- Verser la boue fluide sur un tamis de criblage d'environ 1 mm (cf. point 6.1) posé sur le cône de rinçage de l'élutriateur (1). Laver le contenu du tamis de criblage par un courant d'eau et mélanger au besoin la boue retenue pour faciliter le passage dans le tamis. Le niveau maximum d'eau à ajouter pour faire passer la boue ne doit pas dépasser le prisme de diffusion (3).
- Ouvrir la vanne de remplissage (4) à son débit maximum permettant la mise en suspension de l'intégralité de la boue dans la colonne d'eau. Cette phase de brassage doit permettre de remettre en suspension l'intégralité de la sédimentation présente dans la zone de décantation (6). Si ce n'est pas le cas, s'assurer du bon entretien du matériel (cf. point 6.3).
- Lorsque que le niveau du repère de la partie verticale du cône (2) est atteint, réduire, à l'aide de la vanne de remplissage (4), le courant ascendant à un débit de 35-40 L/h. Cette phase à débit constant de 35-40 L/h se réalise jusqu'au repère 8L et permet la stratification des nématodes et des éléments texturaux du sol dans l'élutriateur.

*Remarque : le contenu du tamis de criblage est éliminé et traité de façon appropriée pour éviter tout risque de dissémination.*

### 9.1.4 Récupération par filtration

Une fois le repère 8L atteint, tout en conservant le courant ascendant à 35-40 L/h, ouvrir le tuyau de vidange (5) (sans tamis de récupération) à débit important (tout en évitant les projections) jusqu'à ce que le niveau de la surface de l'eau atteigne rapidement le repère 6L, puis refermer le tuyau de vidange. Cela permet donc d'éliminer deux litres du volume de l'élutriateur rapidement. Disposer alors, sous ce tuyau (5), deux tamis de récupération de maille 40 µm légèrement inclinés de façon à pouvoir contrôler le contenu du tamis inférieur et prévenir des colmatages (cf. Figures 2 pour la disposition des tamis).

Pour une grande majorité des sols, cette étape permettra d'éviter un colmatage intégral de toute la surface du premier tamis de récupération.

### 9.1.5 Centrifugation

- Transférer rapidement les contenus des 2 tamis de récupération du point 9.1.4, dans le récipient de centrifugation, en commençant par le tamis supérieur. Compléter *a minima* 1/3 du récipient de centrifugation (la taille du récipient doit être adaptée à la quantité de matière récupérée dans les tamis 40 µm) avec de l'eau et ajouter du kaolin (la quantité de kaolin doit permettre d'obtenir un culot stable, environ 9 g pour un récipient de diamètre d'environ 8.6 cm) et bien homogénéiser avec un ustensile type spatule ou fouet.
- Equilibrer 2 à 2 les récipients de centrifugation et centrifuger la suspension avec une force d'environ 1800 g pour une durée d'environ 4 min. La vitesse et le temps de centrifugation doivent permettre l'obtention d'un culot stable. Après ce premier cycle de centrifugation, éliminer le surnageant contenu dans les récipients de centrifugation et nettoyer délicatement (rinçage ou essuyage) les parois internes afin d'éliminer les petits éléments de matière organique et en prenant bien soin de ne pas toucher le culot.
- Ajouter une faible quantité de MgSO<sub>4</sub> permettant d'homogénéiser la suspension avec un ustensile type spatule ou fouet. Il est important de s'assurer que l'intégralité du culot soit bien remise en suspension. Compléter *a minima* 1/3 du récipient de centrifugation avec du MgSO<sub>4</sub> à densité 1.18. Utiliser un ustensile propre pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée.
- Equilibrer 2 à 2 les récipients de centrifugation (avec la solution de MgSO<sub>4</sub>) et centrifuger la suspension avec une force comprise entre 900 et 1800 g pour une durée comprise entre 2 et 4 min environ.

### 9.1.6 Récupération et conditionnement

- Vider le contenu du récipient de centrifugation sur un tamis propre de 20 µm, préalablement rincé/humidifié.
- Rassembler les particules retenues par le tamis de 20 µm avec de l'eau, en évitant toute projection du contenu du tamis à l'extérieur du tamis, tout en s'assurant de l'élimination de l'intégralité de la solution de MgSO<sub>4</sub>.
- Transférer à l'aide d'un jet de pissette d'eau le contenu du tamis de 20 µm dans un récipient pour la suite de l'analyse.

*Remarque : A ce stade, la suspension peut être conservée quelques jours au froid positif.*

*Remarque uniquement pour les laboratoires étant accrédités sur la méthode ANSES/LSV/MA077 : les étapes 9.1.1 à 9.1.6 (de cette présente méthode), peuvent être remplacées par l'étape d'extraction 8.1 de la méthode MA077.*

### 9.1.7 Conditionnement de l'extrait, prises d'essai pour extraction ADN

- L'extrait de sol obtenu est transféré dans un tube à fond conique d'au moins 30 mL et de préférence transparent.
- Laisser décanter l'extrait au moins 3 heures à température ambiante

*Remarque : l'extrait peut être placé au froid positif pour une durée plus longue mais sa conservation ne doit pas excéder 7 jours à cette étape.*

- Prélever environ 3 mL au fond du tube (culot) de chaque échantillon : ces 3 mL sont répartis équitablement dans 2 microtubes d'environ 1,5 mL (= 2 prises d'essai pour extraction de l'ADN).
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes (durée approximative et vitesse pouvant varier entre 10000 et 15000 g).
- Eliminer le surnageant et conserver le culot.

*Remarque : à l'issue de cette étape, les microtubes contenant le culot peuvent être stockés au congélateur (<-10°C) avant de procéder à la suite de l'analyse.*

## 9.2 Extraction d'ADN

L'automate d'extraction Thermo Electron KingFisher® mL permet de traiter simultanément 15 échantillons.

L'utilisation du kit d'extraction d'ADN *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega réf. FF3750 et FF375) sur l'automate d'extraction Thermo Electron KingFisher® mL nécessite de suivre le protocole ci-dessous :

- Ajouter au culot de l'échantillon :
  - 2 billes de verre de 3 mm et quelques billes de 1 mm
  - 300 µL de Lysis Buffer A.
  - 150 µL de Lysis Buffer B.
- Si les culots sont congelés, s'assurer de leur totale décongélation puis placer les microtubes sur le portoir du broyeur de tissus ; agiter à une fréquence d'environ 30 Hz, pendant environ 40 sec.
- Incuber au moins 10 min à température ambiante.
- Ajouter 450 µL de solution de précipitation (solution bleue) et vortexer.
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes (durée approximative et vitesse pouvant varier entre 10000 et 15000 g)

*Agiter la solution de Magnesil™ PMPs au moins 30 sec.; cette solution doit être bien homogénéisée avant utilisation.*

- Disposer le nombre de barrettes de tubes nécessaire sur le plateau de l'automate, en fonction du nombre d'échantillons à traiter ; mettre en place les protections des barreaux aimantés de l'automate. Pour chaque barrette de tubes, distribuer :
  - en position A, 30 µL de *Magnesil™ PMPs* et 350 µL d'isopropanol.
  - en position B, 250 µL de *Lysis Buffer B*.
  - en positions C et D, 1 mL d'éthanol à 70%.
- Reprendre les microtubes centrifugés ; pour chaque échantillon, transférer 400 µL du surnageant (ADN en solution) dans le premier tube (position A) disposé sur le plateau de l'automate (contenant déjà 30 µL de *Magnesil™ PMPs* et 350 µL d'isopropanol).
- Positionner le plateau porte-tubes dans l'automate (s'assurer que les protections des barreaux aimantés soient bien en place), puis lancer le programme.

*Script du programme en annexe 2, et disponible auprès du LNR.*

- A la fin de l'étape de séchage (étape *Dry* sur le *script*), retirer le plateau et distribuer 100 µL d'eau à 65°C (qualité biologie moléculaire) dans la position E de chaque barrette de tubes.
- Re-positionner le plateau porte-tubes dans l'automate et re-lancer le programme (touche *start*).
- A l'issue du processus d'extraction, retirer le plateau et collecter les éluats.
- Cette solution d'ADN total constituera la solution directement analysée par PCR temps réel (=  $S_{ADN}$ ). Elle peut être stockée au froid positif si les ADN élués sont utilisés dans les 24 heures, ou bien au congélateur (<-10°C) s'ils sont utilisés postérieurement.

*Remarque : les volumes indiqués sont approximatifs mais les proportions doivent être respectées.*

### 9.3 Détection par PCR temps réel

Les tests de détection étant des simplex, deux PCR distinctes sont réalisées, une pour chaque cible. Toutes les S<sub>ADN</sub> sont analysées en duplicitat.

#### 1. Préparation des mélanges réactionnels

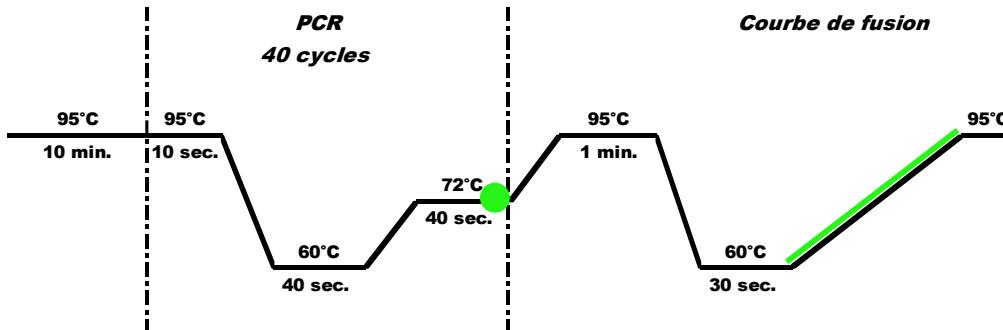
La composition des mélanges réactionnels est la suivante (pour le réactif *Light Cycler® 480 SYBRGreen I Master*). Un mélange réactionnel par cible est préparé (PCR en *simplex*)..

| Réactifs                        | Concentration | Volume pour        |
|---------------------------------|---------------|--------------------|
|                                 | Finale        | 1 réaction (20 µl) |
| Mastermix 2X                    | 1 X           | 10                 |
| Primers mix 10X                 | 1 X           | 2                  |
| TIA 100X                        | 1 X           | 0,2                |
| H <sub>2</sub> O (qualité PCR)  | —             | 4,80               |
| Ajouter 3 µl S <sub>ADN</sub> à |               | 17µL               |

Remarque : Des PCR sans TIA peuvent être nécessaires selon les résultats obtenus (cf § 9.4.2) Dans ce cas, le volume de solution de TIA est remplacé par un volume équivalent d'eau de qualité PCR.

2. Distribution du mélange réactionnel à raison de 17 µL par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur)
3. Ajout de 3 µL de S<sub>ADN</sub>
4. Amplification

Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant (exemple pour le Roche LC 480):

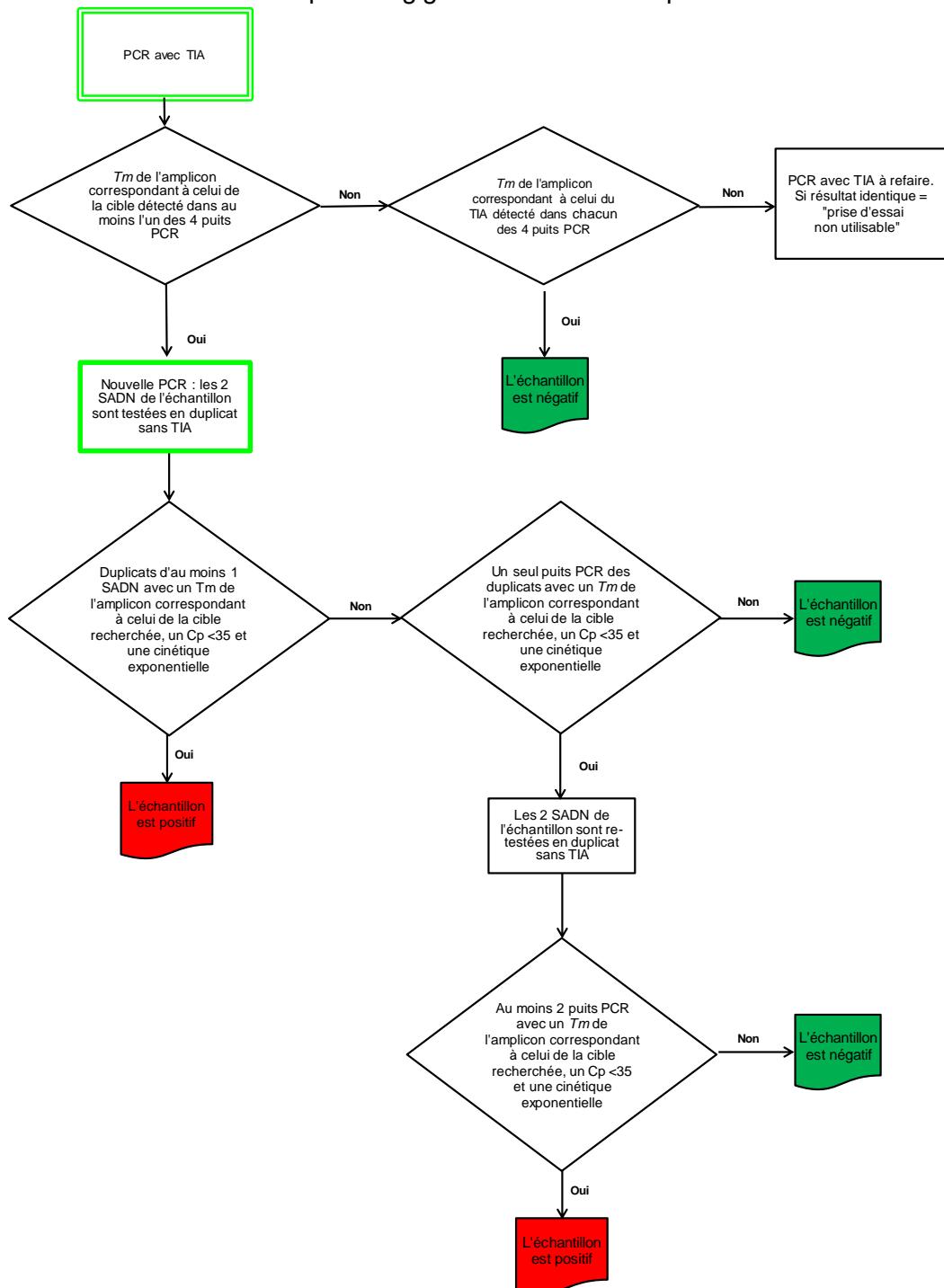


La fluorescence du SYBR Green est mesurée ponctuellement à la fin de chaque cycle et en continu pendant la courbe de fusion (symbolisée en vert sur le programme ci-dessus).

## 9.4 Résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel de l'appareil de PCR temps réel sans intervention manuelle pour fixer la ligne de seuil ou celle du bruit de fond. Une analyse de type quantitative permet de déterminer le crossing-point (ou Cp) et l'analyse des courbes de fusion permet de déterminer la température de fusion ( $T_m$  : melting temperature, ou température à laquelle 50% de l'ADN est passé sous forme simple brin) des produits amplifiés.

L'analyse des résultats est illustrée par le logigramme décisionnel présenté ci-dessous :



Prescriptions des *Tm* pour le couple thermocycleur / pré-mix commercial :

Lightcycler 480 / LightCycler® 480 SYBR Green / Master de la société Roche diagnostics :

|                             | TIA                   | <i>M. chitwoodi</i>  | <i>M. fallax</i>     |
|-----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Test PCR <i>M.chitwoodi</i> | <b>73.60</b><br>± 1°C | <b>82.6</b><br>± 1°C |                      |
| Test PCR <i>M.fallax</i>    | <b>79.60</b><br>± 1°C |                      | <b>82.8</b><br>± 1°C |

Les laboratoires détermineront les *Tm* de chacune des cibles pour chaque couple thermocycleur / mastermix commercial utilisé.

#### 9.4.1 Validation de l'analyse avec TIA

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins. L'acquisition de la fluorescence en continu pendant la lente montée en température (courbe de fusion) permet au logiciel d'évaluer la température de fusion (=*Tm*, ou température à laquelle 50% de l'ADN est passé sous forme simple brin) des produits PCR (= amplicons).

L'analyse est validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni à l'issue des analyses :

- Tous les réplicats des T+proc ont généré un amplicon (courbe avec une cinétique de type exponentielle) dont le *Tm* correspond à celui de la cible recherchée.
- Aucun des réplicats de T-proc et NTC n'a généré un amplicon dont le *Tm* correspond à celui de la cible recherchée (*Meloidogyne chitwoodi* ou *M. fallax*).

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

#### 9.4.2 Interprétation de l'analyse avec TIA

Quand la série d'analyses est validée conformément au paragraphe ci-dessus, les résultats des échantillons peuvent être interprétés de la façon suivante, en observant le ou les *Tm* :

- a) Si un amplicon, dont le *Tm* correspond à celui de la cible recherchée, est détecté dans au moins l'un des 4 puits PCR d'une prise d'essai pour analyse, les 2 S<sub>ADN</sub> devront être testées dans une nouvelle PCR sans TIA. (symbole « + » dans le tableau ci-dessous)
- b) Si un amplicon, dont le *Tm* correspond à celui du TIA, est détecté dans tous les puits des 2 S<sub>ADN</sub>, et en l'absence d'amplicon, dont le *Tm* correspond à celui de la cible recherchée dans les duplicats des 2 S<sub>ADN</sub>, le résultat du test de détection spécifique pour la cible considérée (*Meloidogyne chitwoodi* ou *M. fallax*) est négatif. (symbole « - » dans le tableau ci-dessous)
- c) Si aucun amplicon, dont le *Tm* correspond à celui de la cible ou du TIA, n'est détecté dans aucun des duplicats des 2 S<sub>ADN</sub>, la prise d'essai pour extraction d'ADN, est dans un premier

temps re-testée ; elle est dite « non utilisable » pour la recherche de la cible si ce résultat est reproduit.

Les résultats des échantillons doivent être interprétés de la façon suivante pour l'organisme cible recherché :

|       | <b>S<sub>ADN</sub> n° 1</b> |         | <b>S<sub>ADN</sub> n° 2</b> |         | <b>Interprétation</b>            |
|-------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|----------------------------------|
|       | Puits 1                     | Puits 2 | Puits 1                     | Puits 2 |                                  |
| Cas a | +                           | -       | -                           | -       | Nouvelle PCR sans TIA à réaliser |
| Cas b | -                           | -       | -                           | -       | Echantillon négatif              |
| Cas c |                             |         |                             |         | Nouvelle PCR sans TIA à réaliser |

Pour chaque échantillon, si au moins une des réactions de PCR a généré un résultat positif (=Tm de la cible détecté) lors de la première analyse (avec TIA inclus dans le mix de PCR), une nouvelle PCR est réalisée sur les 2 S<sub>ADN</sub> de l'échantillon concerné. Cette nouvelle PCR est réalisée sans ajout du TIA dans le mix de PCR. Pour la préparation du mix de PCR, le volume de solution de TIA est remplacé par un volume équivalent d'eau de qualité PCR.

#### 9.4.3 Validation des résultats de l'analyse sans TIA

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

L'analyse est validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni à l'issue des analyses :

- Tous les réplicats des T+PCR ont généré un amplicon (courbe d'amplification avec une cinétique de type exponentielle) : Cp< 35 et valeur de Tm conforme aux prescriptions.
- Aucun des réplicats de T-PCR ou NTC n'a généré un amplicon (courbe d'amplification avec une cinétique de type exponentielle) avec un Cp< 35 et un Tm correspondant à la cible recherchée.

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

#### 9.4.4 Interprétation des résultats de l'analyse sans TIA

Après validation de la série, pour chacune des réactions de PCR : observer le *C<sub>p</sub>*, l'aspect de la courbe d'amplification et le *T<sub>m</sub>* : les résultats des échantillons doivent être interprétés de la façon suivante pour l'organisme cible recherché :

| S <sub>ADN</sub> n° 1 |         | S <sub>ADN</sub> n° 2 |         | Résultat de l'échantillon  |
|-----------------------|---------|-----------------------|---------|--|
| Puits 1               | Puits 2 | Puits 1               | Puits 2 |  |
| +                     | +       | +                     | +       | Positif  |
| +                     | -       | +                     | +       | Positif  |
| -                     | -       | +                     | +       | Positif  |
| +                     | -       | +                     | -       | PCR à refaire. Si au moins 2 positifs sur 4, le résultat est interprété comme positif. |
| +                     | -       | -                     | -       | PCR à refaire. Si au moins 2 positifs sur 4, le résultat est interprété comme positif. |
| -                     | -       | -                     | -       | Négatif  |

+ : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de *C<sub>p</sub>* <35 et avec un *T<sub>m</sub>* correspondant à la cible recherchée.

- : absence de courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de *C<sub>p</sub>* <35 ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de *C<sub>p</sub>* <35 mais avec un *T<sub>m</sub>* différent de celui de la cible recherchée.

Si les résultats de la seconde analyse nécessitent de refaire une PCR, elle est réalisée sans ajout de TIA dans le mix de PCR.

## 10. Formulation des résultats

**Le résultat final de l'analyse** est exprimé sous forme qualitative de la façon suivante et selon le test réalisé :

Si « **Détection de *Meloidogyne chitwoodi* par PCR temps réel** » : « **Test négatif** » lorsque le résultat de la prise d'essai pour analyse est négatif ou « **Test positif** » lorsque le résultat de la prise d'essai pour analyse est positif

ou « **Détection de *Meloidogyne fallax* par PCR temps réel** » : « **Test négatif** » lorsque le résultat de la prise d'essai pour analyse est négatif ou « **Test positif** » lorsque le résultat de la prise d'essai pour analyse est positif.

## 11. Caractéristiques de performance de la méthode

### 11.1 Extraction des nématodes à partir d'un sol

Tableau 2 : Taux d'extraction selon les textures de sol et la technique d'éclaircissement

| Elutriation<br>+ Centrifugation |                 |
|---------------------------------|-----------------|
| <b>Limoneux</b>                 | 33,1 %<br>±1,3  |
| <b>Sableux</b>                  | 31,6 %<br>±1,2  |
| <b>Argileux</b>                 | 39,6 %<br>± 1,9 |

± correspond à l'erreur type (StandErr) :  $(\sigma_x) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

Tableau 3 : Caractéristiques des performances analysées (extrait du rapport de validation ANSES/LSV/MA077)

| Caractéristique de performance                   | Valeur obtenue à l'issue de la caractérisation |
|--|--|
| <b>Sensibilité</b><br>(en comparaison à MOA/024) | Supérieur dans <b>100%</b> des cas testés      |
| <b>Répétabilité qualitative</b>                  | <b>100 %</b> positif                           |
| <b>Répétabilité quantitative</b>                 | <b>12,8 %</b> de CV*                           |
| <b>Reproductibilité</b><br>(entre opérateurs)    | <b>95,6 %</b> de CoMoy**                       |

\* CV = Coefficient de Variation

\*\* CoMoy = COncordance des MOYennes

## 11.2 Analyses moléculaires

Tableau 4 : Synthèse et validation des résultats des caractéristiques techniques de l'analyse moléculaire

| Caractéristiques de performances*                                 | Valeurs obtenues à l'issu de la caractérisation pour les 2 cibles |
|---|---|
| Sensibilité analytique / <b>Seuil de détection</b>                | 5L <sub>2</sub> .   |
| Spécificité analytique -Inclusivité / <b>Sensibilité relative</b> | 100%  |
| Spécificité analytique - Exclusivité/ <b>Spécificité relative</b> | 100%  |
| <b>Exactitude/Justesse</b>  | 100%  |
| <b>Répétabilité/Fidélité</b>                                      | 100%  |
| <b>Reproductibilité</b>   | 100%  |
| <b>Robustesse</b>   | 100%  |

La spécificité analytique-inclusivité a été évaluée sur 4 populations de *M. chitwoodi* d'origines géographiques différentes (Pays-Bas, USA, France) et sur une population de *M. fallax* (Pays-Bas).

La spécificité analytique-exclusivité a été évaluée sur une population de *M. artiellia*, 4 populations de *M. hapla* (France), 5 populations de *M. arenaria* (France), deux populations de *M. incognita* (France, Trinidad et Tobago), deux populations de *M. javanica* (Thaïlande et Israël), une population de *M. minor* (Pays-Bas), de *M. naasi* (France), *M. ethiopica* (Slovénie), *M. enterolobii* (USA), deux populations de *Globodera pallida* (France, USA), *G. rostochiensis* (France), *G. tabacum* (France) et une population de *Heterodera cruciferae* (France), *H. schachtii* (France), *Pratylenchus sp.* (France).

## Bibliographie

den Nijs L., Brinkman H., van der Sommen A (2004) A Dutch contribution to knowledge on phytosanitary risk and host status of various crops for *Meloidogyne chitwoodi* Golden et al., 1980 and *M. fallax* KarsSEN, 1996: an overview. *Nematology* 6: 303-312.  
<https://doi.org/10.1163/1568541042360492>

KarsSEN G. (2002) The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* in Europe. Brill Academic Pub (July 1,2002).

## Annexes

### Annexe 1 : Calibration de l'élutriateur

#### a. Création de repères

Deux repères doivent être matérialisés : il s'agit des repères « 6L » et « 8L ». Ces repères sont définis et correspondent aux volumes d'eau contenu dans l'appareil, au-dessus du tuyau de vidange (5). Ces niveaux peuvent être définis par mesures à partir du haut du de l'appareil (cf. Figure 2), ou par remplissage en suivant ces étapes :

- remplir d'eau le bas de l'appareil à l'aide de la vanne de remplissage (4) jusqu'à un écoulement par le tuyau de vidange (5) puis fermer la vanne (4),
- une fois l'écoulement terminé par le tuyau de vidange, le fermer à l'aide d'un système adapté (il est conseillé d'utiliser d'une molette de fermeture permettant le contrôle du débit),
- remplir l'appareil avec environ 6 L d'eau (en versant l'eau par le haut),
- au niveau de la surface de l'eau, inscrire sur l'appareil et de façon permanente le repère « 6L »,
- ajouter 2 L d'eau dans l'appareil (par le haut),
- au niveau de la surface de l'eau, inscrire sur l'appareil et de façon permanente le repère « 8L ».

#### b. Positionnement du cône de rinçage

Le cône de rinçage (1) doit être placé de façon à ce que sa partie basse se situe au même niveau que le repère « 8L » comme schématisé sur la Figure 2. La position de ce cône de rinçage est importante car ses éléments servent également de repères lors de l'extraction (le bas du prisme de diffusion (3) et le repère de la partie verticale (2) avec environ 10,5 cm entre 2 et 3).

#### c. Calibration du débitmètre

Le débitmètre fourni avec l'éluviateur, ou tout autre débitmètre, mesurant l'eau alimentée par la vanne de remplissage (4) doit être vérifié avant la mise en service de l'appareil. En effet, des disparités peuvent être constatées entre les valeurs inscrites sur le débitmètre et le débit réel dans l'éluviateur installé au laboratoire. Il est donc fortement recommandé de bien identifier un positionnement du flotteur pour que le débit se situe à environ  $37,5 \text{ L/h} \pm 2,5 \text{ L/h}$ . Théoriquement pour ces débits, le remplissage d'un volume de 8L doit être compris entre environ 12 et 14 minutes. Il est donc recommandé de vérifier la durée approximative de ce remplissage lors de tests. L'échelle du débitmètre livré avec l'appareil étant peu adaptée pour l'utilisation de cette méthode, il peut être envisageable de le remplacer avec un débitmètre avec une échelle moins étendue (exemple : 5 à 50 L/h).

## Annexe 2 : Script du programme de l'automate KingFisher mL

(pour le MagnetaPure 32 Plus (Nacherey Nagel), se rapprocher du LNR)

Name = promega food 65C

Protocol template version = 2.6.0

Instrument type = KingFisher mL

Creator = LNPV LNN

Created = 27/8/2009 14:58:19

Description = surnageant 400µl + 350 isopro + 30 billes

Kit = PROMEGA FOOD pour sols

Plate layouts = Default

### [ PLATE LAYOUTS ]

---

#### Default

Plate type = KingFisher tubestrip 1000 ul

Plate change message = Change Default

A:

- volume = 400, name = surnageant lysat centrifugé

- volume = 350, name = ISOPROPANOL 0.8 V

- volume = 30, name = Magnesil

B:

- volume = 250, name = lavage Lysis buffer B

C:

- volume = 1000, name = Lavage EtOH 70

D:

- volume = 1000, name = Lavage EtOH 70

E:

- volume = 100, name = Eau BM à 65 C°

### [ STEPS ]

---

#### BIND

##### Step parameters

- Name = Binding

- Well = A, Default

**Beginning of step:**

- Premix = Yes

**Bind parameters:**

- Bind time = 5min 0s, speed = Fast dual mix

**End of step:**

- Collect beads = Yes, count = 3

---

## WASH

**Step parameters**

- Name = Wash 1 lysis buffer
- Well = B, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Fast

**Wash parameters:**

- Wash time = 2min 0s, speed = Fast dual mix

**End of step:**

- Collect beads = Yes, count = 3

---

## WASH

**Step parameters**

- Name = Wash 2 ethanol
- Well = C, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Fast

**Wash parameters:**

- Wash time = 2min 0s, speed = Fast dual mix

**End of step:**

29 /31

- Collect beads = Yes, count = 3
- 

## WASH

### Step parameters

- Name = Wash 3 ethanol
- Well = D, Default

### Beginning of step:

- Release = Yes, time = 10s, speed = Fast

### Wash parameters:

- Wash time = 2min 0s, speed = Fast dual mix

### End of step:

- Collect beads = Yes, count = 3
- 

## DRY

### Step parameters

- Name = Dry
  - Well = D, Default
  - Dry time = 10min 0s
  - Tip position = Outside well
- 

## PAUSE

### Step parameters

- Name = Pause
  - Well = D, Default
  - Message = Ajout 100 eau BM 65C
  - Dispense:Elution buffer, volume=ul
- 

## ELUTION

### Step parameters

- Name = Elution
-

- Well = E, Default

**Beginning of step:**

- Release = Yes, time = 10s, speed = Fast

**Elution parameters:**

- Elution time = 2min 0s, speed = Fast

**Pause parameters:**

- Pause for manual handling = No

**Remove beads:**

- Remove beads = Yes, collect count = 3, disposal well = B