

Méthode d'analyse en Santé des Végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA082- Version 1

Juillet 2025

Détection de *Pyricularia oryzae* lignée *Triticum* 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 »

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*	Sans objet	2025	Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 17/06/2025 au 30/06/2025 sur le site internet de l'agence.

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 version de la méthode a été rédigée en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par l'unité de Mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en collaboration avec l'UMR PHIM. Ce projet visait à développer des tests rapides pour la détection spécifique de la lignée pathogène sur blé (lignée *Triticum*) du champignon phytopathogène *Pyricularia oryzae* agent du « wheat blast ». (Thierry et al., 2019 ; 2020).

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction.....	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	9
4. Principe de la méthode.....	9
5. Réactifs.....	10
5.1 Kits d'extraction d'ADN	10
5.2 Oligonucléotides	10
5.3 Kit d'amplification pour PCR en temps réel.....	10
5.4 Autres consommables à usage unique	11
5.5 Contrôles et témoins.....	11
6. Appareillage et matériels.....	13
7. Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	14
8. Mode opératoire.....	14
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Extraction d'ADN total	16
8.3 Tests de PCR en temps réel.....	17
9. Résultats	18
9.1 Contrôle de la validité des résultats	18
9.2 Calculs et expression des résultats	18
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	19
Annexe 1 : tables décisionnelles	23
Bibliographie.....	25

Table des figures

FIGURE 1 : PRINCIPE DE LA METHODE	9
--	----------

Table des tableaux

TABLEAU 1 : SEQUENCES DES AMORCES ET SONDAS UTILISEES DANS CETTE METHODE	10
TABLEAU 2 : COMPOSITION DES MELANGES REACTIONNELS C45/18S UNI/C17.....	17
TABLEAU 3 : SYNTHESE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE.....	19
TABLEAU A1 : PCRS REALISEES SUR S_{ADN}	23
TABLEAU A2 : PCRS REALISEES SUR S_{ADN} DILUEES 10 FOIS	24

Introduction

La pyriculariose du blé (wheat blast) est une maladie émergente qui met en péril la production de blé à l'échelle mondiale. La maladie induit des lésions nécrotiques sur les feuilles, les tiges et les grains, ainsi que le blanchiment des épis, qui contiennent des grains vides ou manquants. Elle a été signalée pour la première fois en 1985 et s'est répandue au Brésil, avant de gagner d'autres pays d'Amérique du Sud comme la Bolivie, le Paraguay et l'Argentine. Cette maladie dévastatrice a été récemment signalée sur le continent asiatique, atteignant le Bangladesh en 2016, et ce saut dans une région aussi éloignée du globe a été attribué à l'introduction de semences infectées en provenance d'Amérique du Sud. L'agent causal est une lignée génétique particulière du champignon *Pyricularia oryzae*, appelée *Triticum* (*Pot*), qui se disperse sur de courtes distances par ses conidies, par le vent ou par les éclaboussures de pluie pendant la croissance végétative du blé. Le champignon peut se propager davantage par le commerce de semences de blé contaminées. Il est donc primordial que les lots de semences de blé soient testés avant d'être commercialisés afin d'éviter la propagation de la maladie sur de longues distances.

Les symptômes de la pyriculariose sur les grains de blé sont parfois difficiles à observer, et peuvent être confondus avec ceux causés par la fusariose de l'épi. En outre, les semences prélevées sur des épis d'apparence saine de certains cultivars de blé peuvent avoir un degré d'infection similaire et ne présenter aucun symptôme. L'analyse en laboratoire des semences est donc nécessaire pour tester la présence de la lignée *Triticum* de *P. oryzae*. *P. oryzae* englobe de nombreuses lignées génétiques qui sont indistinguables par leur morphologie. L'identification de la lignée génétique *Triticum*, qui est la seule capable de provoquer des épidémies de pyriculariose sur le blé, repose soit sur des tests de pathogénicité sur des cultivars de blé, soit sur des tests moléculaires. Les tests de pathogénicité sont chronophages et nécessitent l'isolement préalable de l'agent pathogène en culture pure, ainsi que des installations de biosécurité permettant de cultiver le blé tout au long de l'année. En revanche, l'approche de détection présentée dans cette méthode utilise deux tests PCR en temps réel, réalisés sur de l'ADN directement extrait d'échantillons de blé, et fournit un résultat en quelques jours. Plusieurs tests PCR, PCR en temps réel ou LAMP sont actuellement disponibles, et ont été conçus sur la base de la génomique comparative. Cependant, aucun d'entre eux ne s'est avéré être spécifique à 100%. Il convient de noter que plusieurs études ont démontré que des flux génétiques se produisent entre différentes lignées de *P. oryzae*, et que des réactions croisées sont signalées dans les tests décrits avec de l'ADN provenant de lignées non ciblées. Cependant, une combinaison des tests décrits ici, chacun ciblant des loci différents dans la lignée de *P. oryzae Triticum*, permettra de sécuriser le diagnostic.

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.

Bien que *P. oryzae* lignée *Triticum* ne soit pas réglementée comme organisme de quarantaine pour l'UE, il est fortement recommandé de respecter un confinement de type NS3 pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne.

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 mix et chargement des solutions d'ADN (S_{ADN}) peuvent être éliminés sans traitement particulier.

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de la lignée *Triticum* de *Pyricularia oryzae* sur blé. La présence de cet agent pathogène est mise en évidence par une combinaison de deux tests de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant chacun deux amorces et une sonde d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *Pot* dans la limite du seuil de détection des techniques employées, sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels un résultat négatif est obtenu sont considérés comme indemnes de la *Pot* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par les techniques utilisées.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :

Cette méthode concerne les grains, les glumes et les feuilles de blé (*Triticum* spp.), ainsi que sur des isolats fongiques en culture pure.

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

Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur grains, glumes et feuilles de blé. Elle n'a pas été validée sur d'autres organes de la plante (tige, etc.). Néanmoins, ces derniers peuvent être analysés, en ciblant les portions de tissus symptomatiques et en adaptant en conséquence le protocole de broyage et en s'affranchissant de l'étape d'enrichissement biologique, mais sans pouvoir garantir un niveau de sensibilité équivalent.

Grandeur de l'objet soumis à analyse :

Les échantillons soumis à l'analyse seront ainsi constitués d'un prélèvement de feuilles, de glumes ou de 400 grains de blé, réalisé aléatoirement dans l'échantillon reçu pour analyse. Dans le cas où l'échantillon reçu au laboratoire ne permet pas le prélèvement d'environ 400 grains, l'ensemble de l'échantillon reçu sera pesé (si poids non indiqué) et utilisé comme échantillon pour analyse. Le rapport d'essai mentionnera dans ce cas que l'analyse n'a pu être réalisée que sur X g de graines (< 400 grains) et que le résultat de l'analyse doit être interprété en conséquence.

2. Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes
- [2] MIAM018 : Dossier de validation pour le développement d'un test de détection de *Pyricularia oryzae* lignée *Triticum*

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...).

4. Principe de la méthode

Le test **C45** est utilisé pour la détection de *Pot*, il est complété par un autre test de contrôle qualité de l'extraction d'ADN **18S uni**, permettant d'exclure les résultats faussement négatifs causés par un extrait d'ADN de qualité / quantité insuffisante. Seuls les extraits d'ADN positifs à l'issu du test **C45** sont systématiquement analysés par le test de confirmation **C17**.

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-après.

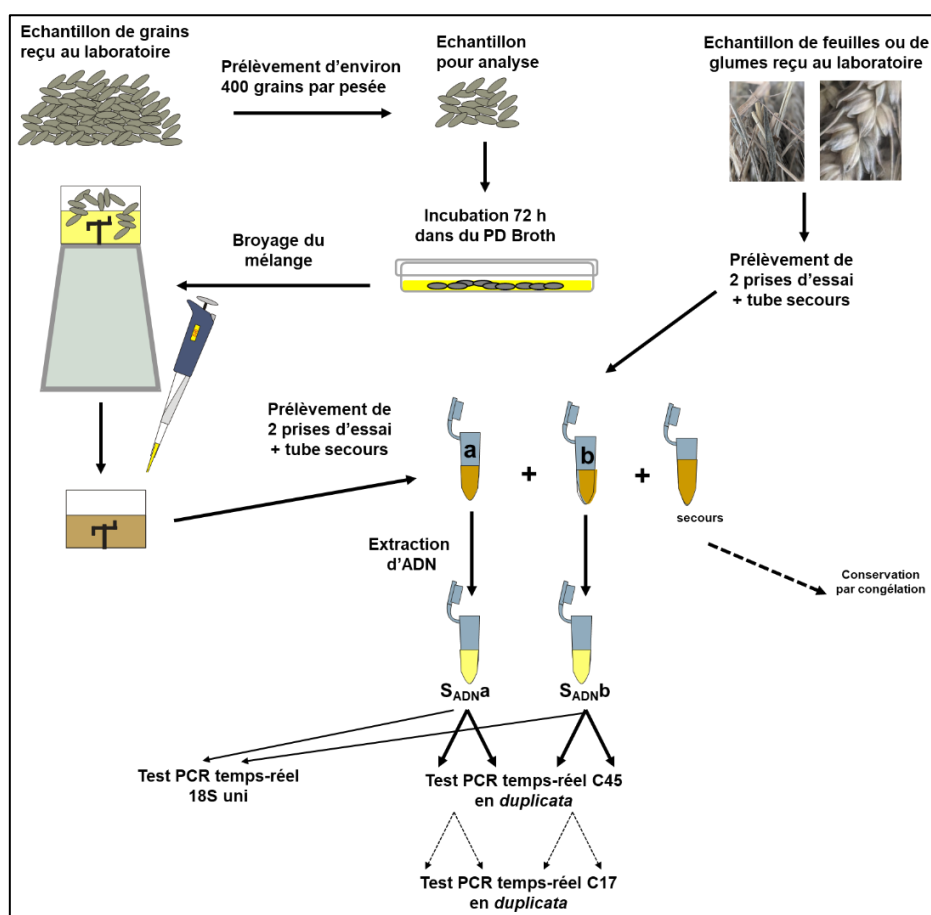


Figure 1 : Principe de la méthode

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 influencer 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 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal et ADN de microorganismes présent sur le prélèvement) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le Nucleospin Plant II extraction kit (Macherey-Nagel), (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018, Thierry et al., 2020).

5.2 Oligonucléotides

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

Cible	Amorce ou sonde	Séquence (5'-3')
<i>P. oryzae</i> lignée <i>Triticum</i> scaffold 15 genome BR0032	C45-F ^a	TCTTCACTCCTCCGAAAGAC
	C45-R ^a	GTA TAG CTG GGTATCTTGGTAGAC
	C45-P ^a	[FAM]- TGCCCTCATCAAAACCTGCAGCCAT- [BHQ1]
<i>P. oryzae</i> lignée <i>Triticum</i> scaffold 15 genome BR0032	C17-F ^b	CGATAGAACTTGAGGAAGATCAAGTAAG
	C17-R ^b	TCACCGAGAGATGTGCCAC
	C17-P ^b	[FAM]- TCGCTAACAATGTCCACCCCGCC-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^c	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^c	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^c	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^aThierry et al (2020)

^bThierry et al (2019)

^cIoos et al. (2009)

Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.3 Kit d'amplification pour PCR en temps réel

Les kits d'amplification initialement validés pour cette méthode sont le qPCR MasterMix No ROX (Eurogentec) pour le test C45 et le qPCR core kit No ROX (Eurogentec) pour le test C17 (cf. dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018, Thierry et al. 2019 ; 2020). Ces kits n'étant plus commercialisés, seul le kit PerfeCTa®

10 / 25

qPCR ToughMix® (Quantabio) a été ultérieurement validé pour les deux tests (cf. dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018).

5.4 Autres consommables à usage unique

- Eau ultrapure (EUP). Cette eau doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.
- Milieu liquide Potato Dextrose Broth (PD Broth). Le PD Broth est reconstitué à partir d'une poudre prête à l'emploi (2% de dextrose et 0.4% d'amidon de pomme de terre en concentration finale) en suivant les recommandations du fournisseur, puis stérilisé par autoclavage.
- Boîtes de Petri stériles de 90 mm de diamètre, pour l'enrichissement biologique des grains de blé à tester.
- Microcônes stériles à filtre de volumes 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 (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage de tissus végétaux.
- Microtubes de lysing matrix C (MP Biomedicals) ou microtubes stériles de 2 mL à vis contenant environ 8 mg de billes de verre stérilisées de diamètre de 0,75 à 1 mm (VWR, réf 4122917) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des cultures fongiques.

5.5 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 des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont à minima 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. 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 C45 ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une réaction séparée du test de détection C45. L'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le C_t (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de C_t acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur le type de matrice testé (grains de blé, feuilles, glumes) dans ses propres

conditions. Dans les conditions de validation de ce test la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 13,23 pour les grains de blé et 21,56 pour les feuilles et les glumes (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018).

- **Un témoin négatif de processus (T_{proc})** sera préparé pour toute série d'extractions **d'échantillons issus de grains de blé** et utilisé lors des tests C45 et C17. Ce témoin est constitué de PD Broth stérile qui sera incubé en parallèle aux autres échantillons pour analyse. Ce T_{proc} sera traité comme un échantillon pour analyse, mais ne subira pas la phase de broyage : une unique prise d'essai d'environ 500 μL sera réalisée directement à partir de la flasque pour extraction d'ADN une fois l'incubation terminée. Ce témoin subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'enrichissement et d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Le tube faisant fonction de T_{proc} doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.
- **Un témoin négatif d'extraction (T_{extr})** sera préparé pour toute série d'extractions **d'échantillons de feuilles et/ou de glumes**. Une prise d'échantillon "vide" ($=T_{\text{extr}}$), c'est-à-dire un microtube vide de lysing matrix A ou C 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 (1er type de faux positif) et sera testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN. Le tube faisant fonction de T_{extr} doit impérativement être ouvert avant toute manipulation d'échantillons, rester ouvert pendant toute la phase de manipulation des échantillons, et être refermé à la fin de la manipulation des échantillons, et ce, à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.
- **Un témoin positif de test 18S uni ($T_{+18\text{S triticum}}$)** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce $T_{+18\text{S triticum}}$ est constitué d'une solution d'ADN génomique extraite de blé à une concentration finale 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 C45 et C17. 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 *Pot* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ces protocoles. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR spécifique C45 ou C17, respectivement. Ces deux T_{+LOD} (C45 et C17) doivent être caractérisés par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T_{+LOD} peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été déterminée à 240 et 47.8 copies plasmidiques de cible par tube de PCR, respectivement pour les tests C45 et C17 (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018).
- **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 C45, C17 et 18S uni. 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 (2ème type de faux positifs).

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

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 MOA 022.

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 fluorophores de type « FAM », « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene-Q, Qiagen (cf. Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 018).
- 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).
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à $22\pm 6^{\circ}\text{C}$
- Broyeur de graines de volume de broyage adapté et capable d'homogénéiser un mélange d'échantillon de graines et de milieu liquide. Il est indispensable de posséder plusieurs bols de broyage identiques et entièrement stérilisables.
- 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.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

- **Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse** : Les échantillons sont constitués de grains, de glumes ou de feuilles de *Triticum* sp., ou également d'un isolat fongique en culture. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible.
- **Confection du colis** : Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique « quarantaine » doit figurer sur le colis.
- **Fiche de demande d'analyse** : formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

En attendant l'analyse, l'échantillon devra être conservé au réfrigérateur. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 21 jours.

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) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. 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.

8.1.1 Grains de blé

A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, un prélèvement d'environ 400 grains est effectué de façon aléatoire, à l'aide d'outils de prélèvement préalablement désinfectés par flambage ou à l'hypochlorite de sodium. Le prélèvement de l'équivalent de 400 grains peut se faire par pesée en préparant 3 séries de 10

grains, en les pesant, et en multipliant le poids moyen obtenu par 40. Une quantité de graines correspondant à ce poids de 400 grains sera prélevée et pesée.

L'échantillon pour analyse sans prétraitement ni stérilisation externe est directement transféré dans une ou plusieurs boîtes de Petri stériles dans lesquelles on procédera à l'enrichissement biologique :

- a) Etaler les grains dans la ou les boîtes de Petri de manière à n'obtenir qu'une couche d'une graine d'épaisseur.
- b) Ajouter environ 15 mL de PD Broth dans chaque boîte. Incuber le mélange graines/PD Broth pendant 72 à 80 heures à $22^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$.
- c) Après incubation, ajouter le contenu de chaque boîte dans un bol de broyage du mixeur à 30 mL de PD Broth stérile. Broyer l'ensemble des grains et le milieu d'enrichissement jusqu'à obtenir un broyat liquide suffisamment homogène.
- d) Prélever de façon aléatoire dans le broyat deux prises d'essai (a et b) d'environ 500 μL , en utilisant un cône de micropipette adapté (à tronquer si besoin) et transférer chaque prise d'essai dans un microtube stérile de 2 mL. A cette étape, environ 1000 μL de broyat doivent être prélevés en supplément, identifiés et conservés congelés en cas de nécessité de confirmation d'un positif.

8.1.2 Cultures pures, glumes et feuilles de blé

➤ Tissus végétaux :

A cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de fragments de tissus végétaux, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par le laboratoire national de référence.

- A partir de feuilles, des fragments (environ 2 x 2 x 5 mm) sont découpés préférentiellement dans les zones nécrosées si elles sont visibles (biomasse de *Pot* plus importante à ces endroits) à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Ces fragments sont ensuite mélangés, puis prélevés aléatoirement et transférés dans deux microtubes de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus et consommable(s) de broyage) représentant environ 1/4 du microtube (cf Annexe 2).
- A partir de glumes, transférer dans deux microtubes de lysing matrix A, une à quatre glumes avec symptômes dont le volume maximal représentera environ 1/4 du microtube (cf Annexe 2).

Les échantillons ainsi conditionnés en microtubes peuvent être conservés au congélateur jusqu'à 1 mois avant le début de l'analyse.

➤ Culture pure :

Le prélèvement doit s'effectuer sur une culture de moins de 2 mois. Le mycélium sera prélevé en raclant la surface de la culture à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placé dans un tube de lysing matrix C ou équivalent. La quantité de mycélium récolté doit correspondre au volume d'une bille d'environ 3-4 mm de diamètre.

Les échantillons ainsi conditionnés en microtubes peuvent être conservés au congélateur jusqu'à 1 mois avant le début de l'analyse.

8.2 Extraction d'ADN total

- a) Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif de processus (grains de blé) ou de témoin négatif d'extraction (feuilles et/ou glumes) sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
- b) Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai, centrifuger brièvement ce dernier afin de concentrer vers le fond toutes les particules de broyat et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.
- c) Ajouter dans chaque microtube de prise d'essai le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
- d) **Uniquement pour les tubes contenant les prises d'essai autres que les grains :** placer les microtubes sur le portoir du broyeur FastPrep et broyer environ 1 minute à 6,5 m/s. Laisser reposer quelques secondes, puis recommencer cette étape une deuxième fois. Centrifuger les microtubes quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
- e) Incuber chaque tube environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
- f) À la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à une accélération supérieure ou égale à 20.000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
- g) Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
- h) À la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total issu de chaque prise d'essai est élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'éluion. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Tests de PCR en temps réel

a) Préparation des mélanges réactionnels des différents tests

Le volume réactionnel de chaque test est 20 μL : 18 μL de mélange réactionnel et 2 μL de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel des différents tests est la suivante :

Tableau 2 : composition des mélanges réactionnels C45/18S Uni/C17

Composé			Concentration finale
Test C45 ¹	Test 18S Uni ²	Test C17 ³	
Eau Ultra Pure			qsp 18 μL
PerfeCTa® qPCR ToughMix® (Quantabio)			1x
Amorce sens C45-F	Amorce sens 18S uni-F	Amorce sens C17-F	0.3 μM
Amorce antisens C45-R	Amorce antisens 18S uni-R	Amorce antisens C17-R	0.3 μM
Sonde C45-P	Sonde 18S uni-P	Sonde C17-P	0.1 μM

¹ Thierry et al., 2020

² loos et al., 2009

³ Thierry et al., 2019

Les dispositions suivantes sont communes aux tests C45, C17 et 18S uni :

- Les mélanges réactionnels se préparent individuellement dans un microtube stérile de 1,5 ou 2 mL.
- Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants de chaque mélange réactionnel sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
- Le microtube contenant le mélange réactionnel complet doit être passé au vortex pendant 5 à 10 secondes environ, avant sa distribution.
- Le mélange réactionnel est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 μL par microtube.
- L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de témoins s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est souhaitable d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.
- 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'un microcône stérile à embout filtre.
- Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en *duplicata* : T_{-proc} ou T_{-extr} (C45 et C17), T_{+LOD} (C45 et C17), T_{+18S triticum} (18S uni), NTC (C45, C17 et 18S uni). Pour le NTC, on substitue 2 μL d'eau ultra pure à la S_{ADN} . 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.
- Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

b) Paramétrage des différents tests

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour les trois tests sont les suivants :

- Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN pendant 3 min
- 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 sec et d'hybridation-polymérisation à 65°C pendant 55 sec puis mesure de la fluorescence.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

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

- Aucun des réplicats de T_{proc} ou T_{extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => 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 fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => 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 du T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => 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 *P. oryzae* lignée *Triticum*.

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

Pour chacune des réactions de PCR C45 ou C17, relever le Ct moyen du contrôle T_{+LOD} (=Ct_{LOD}). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct moyen est inférieur à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs.

Chaque prise d'essai est analysée indépendamment l'une de l'autre. Si au moins une prise d'essai sur les deux est positive, *P. oryzae* lignée *Triticum* est considéré comme détecté dans l'échantillon.

En cas de résultat « détection de *P. oryzae* lignée *Triticum* » pour un échantillon, le résultat sera exprimé par une phrase du type « Suspicion de présence de *P. oryzae* lignée *Triticum* dans l'échantillon analysé ». Dans le cadre d'analyses officielles, ce résultat est accompagné obligatoirement d'une mention précisant que « la présence définitive de *P. oryzae* lignée *Triticum* sera confirmée par la réalisation d'analyses complémentaires par le LNR »

L'analyse des résultats pour un échantillon, ainsi que les règles de décision applicables sont présentées en annexe 1 (tables décisionnelles).

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MIAM 018 avec le kit PerfeCTa® qPCR ToughMix® (Quantabio) et sur un appareil Rotorgene 6500 (Corbett Research).

Tableau 3 : synthèse des caractéristiques de performance

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques des réactions de PCR en temps réel	<p>L'efficacité (E) de la réaction C45 sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du Tris EDTA (1x), a été évaluée à : 93% ($R^2=0,9942$)</p> <p>L'efficacité (E) de la réaction C17 sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du Tris EDTA (1x), a été évaluée à : 95% ($R^2=0,987$)</p>
Sensibilité analytique	<p>La sensibilité analytique du test C45 a été estimée 240 copies plasmidiques d'ADN cible par tube de PCR (soit 120 cp/μL).</p> <p>La sensibilité analytique du test C17 a été estimée 47,8 copies plasmidiques d'ADN cible par tube de PCR (soit 23,9 cp/μL).</p>
Spécificité analytique	<p>La spécificité analytique des tests C17 et C45 a été évaluée <i>in vitro</i> sur 109 souches de différentes espèces proches de la cible ou de <i>P. oryzae</i> dont 16 correspondaient à des lignées <i>autres que</i> « <i>Triticum</i> », à partir d'extraits d'ADN dilués à 0,5 ng/μL.</p> <p>Les résultats sont synthétisés dans le tableau ci-dessous :</p>

	Isolat/Lignée (nb isolat)	résultat test C45	résultat test C17	résultat global
	Pyricularia oryzae lignée bromus (3)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée echinochloa (9)	1 POS (Cd88215) 8 NEG	2 POS (IR0102, CR0023) 7 NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée eleusine (12)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée eragrostis (2)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée eriochloa (1)	NEG	POS (JP0033)	NEG
	Pyricularia oryzae lignée leersia (7)	NEG	3 NEG 4 ind	NEG
	Pyricularia oryzae lignée leptochloa (1)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée lolium (19)	1 POS (LpKY97) 1 IND (CR0057) 18 NEG	1 POS (CR0057) 18 NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée oryzae (23)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée panicum (9)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée paspalum (3)	1 POS (Pd88413) 2 NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée pennisetum (1)	IND (JP0035)	POS (JP0035)	NEG
	Pyricularia oryzae lignée phalaris (1)	NEG	POS (AG0067)	NEG
	Pyricularia oryzae lignée setaria (9)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée stenotaphrum (4)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia oryzae lignée zea (4)	NEG	NEG	NEG
	Pseudopyricularia cyperi (1)	NEG	NEG	NEG
	Pseudopyricularia sp. (2)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia ctenantheicola (1)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia kiggnsii (1)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia brachiaria (1)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia penniseticola (2)	1 POS (ML0031) 1 NEG	NEG	NEG
	Pyricularia pennisetigena (2)	NEG	NEG	NEG
	Pyricularia penniseticola (1)	NEG	NEG	NEG
	<p>Seuls deux souches pourraient être détectées avec les deux tests. Cependant, ces deux souches ont été isolés sur des plantes non-hôtes, et a priori ne devraient pas être présents sur des échantillons de blé envoyés au laboratoire pour analyse</p> <p>Les tests n'étant pas 100% spécifiques, un test complémentaire, tel que celui développé par Pieck et al, 2017, devra être entrepris en cas de résultat douteux.</p>			
Inclusivité	<p>L'inclusivité des tests PCR en temps réel C17 et C45 a été démontrée in vitro sur un panel représentatif de 31 souches de la lignée <i>Triticum</i> de <i>P. oryzae</i>. Toutes les souches ont été détectées par le test C45 quelle que soit leur origine. Pour le test C17, seules trois souches (BL0042, BL0066, BL0074) n'ont pas été détectées. C17 étant un test de confirmation, en cas de résultat négatif, il sera donc nécessaire de réaliser un troisième test (test développé par Pieck et al, 2017) sur des souches provenant de <i>Triticum</i> sp.</p>			
Répétabilité et reproductibilité	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD (10xLOD et 100xLOD), sur 10 réplicats d'ADN extrait à partir de grains de blé sain (mix blé sain), sur 10 réplicats d'ADN extrait à partir d'une culture pure de lignée cible (BL0044) et de deux cultures pures de lignée non-cible (AG0064 et INO113).</p> <p>Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :</p> <p>Répétabilité :</p>			

Répétabilité						
Test C17	Sample	Valeur assignée	Ct moy	S.D.	Résultat qualitatif	C.V.
	10LOD	POS	29,816	0,34	POS	1,15
	100LOD	POS	26,149	0,14	POS	0,53
	BL0044	POS	25,06	0,96	POS	3,83
	AG0064	NEG	39,752	0,78	NEG	1,97
	IN0113	NEG	35,969	0,97	NEG	2,69
	Mix blé sain	NEG	40	0,00	NEG	0,00
Test C45	10LOD	POS	29,439	0,21	POS	0,71
	100LOD	POS	25,766	0,14	POS	0,53
	BL0044	POS	26,176	0,17	POS	0,66
	AG0064	NEG	35,784	0,51	NEG	1,43
	IN0113	NEG	37,422	1,54	NEG	4,11
	Mix blé sain	NEG	40	0,00	NEG	0,00

Reproductibilité :

Test PCR en temps réel C45 :

Test C45	Sample	Valeur assignée	Ct moy	S.D.	sultat qualita	C.V.
	10LOD	POS	29,07	0,40	POS	1,39
	100LOD	POS	25,35	0,38	POS	1,49
	BL0044	POS	27,31	0,70	POS	2,57
	AG0064	NEG	37,56	2,29	NEG	6,10
	IN0113	NEG	38,12	2,47	NEG	6,48
	Mix blé sain	NEG	40	0,00	NEG	0,00

Test PCR en temps réel C17 :

Test C17	Sample	Valeur assignée	Ct moy	S.D.	Résultat qualitatif	C.V.
	10LOD	POS	29,62	0,46	POS	1,56
	100LOD	POS	26,76	0,39	POS	1,45
	BL0044	POS	26,34	0,70	POS	2,65
	AG0064	NEG	39,09	1,95	NEG	4,99
	IN0113	NEG	36,85	2,63	NEG	7,14
	Mix blé sain	NEG	40	0,00	NEG	0,00

La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 % pour les deux tests.

Les tests sont donc jugés répétables et reproductibles.

Sensibilité relative Spécificité relative Exactitude relative	Test PCR en temps réel C45 : Non évalué. Test PCR en temps réel C17 : Non évalué.
Autres critères <i>Durée d'analyse</i>	Durée de la méthode PCR en temps réel C45 (+ C17 en cas de positif) : environ une journée
Autres critères <i>Contrôle de la qualité d'un extrait d'ADN</i>	Afin de valider la qualité d'un extrait d'ADN, une valeur maximale acceptable de Ct a été établie pour le test 18S uni (test de contrôle de la qualité de l'ADN extrait). Ce seuil a été déterminé à 13,23 sur une série de 90 valeurs de Ct pour les grains et 21,56 sur une série de 180 valeurs de Ct pour les glumes et les feuilles. Pour les grains, ces valeurs ont été obtenues à partir de 2 prélèvements sur 15 échantillons différents de blé, et pour les feuilles et les glumes ces valeurs ont été obtenues à partir de 15 prélèvements à partir de deux échantillons différents de blé.

Annexe 1 : tables décisionnelles

Tableau A1 : PCRs réalisées sur S_{ADN}

Test C45		Décision	Test C17		Décision	Test 18S Uni		Décision	Résultat
Puits 1	Puits 2		Puits 1	Puits 2		Puits 1	Puits 2		
+	+	Réaliser le test C17	+	+	Arrêt de l'analyse				<i>P. oryzae</i> lignée <i>triticum</i> détecté : suspicion de présence
+	+	Réaliser le test C17	-	-	Réaliser des analyses complémentaires ¹				
-	-	Interpréter le test 18S Uni				+ ²	+ ²	Arrêt de l'analyse	<i>P. oryzae</i> lignée <i>triticum</i> non détecté au seuil de détection de la méthode
-	-	Interpréter le test 18S Uni				- ³	- ³	Refaire la PCR sur SADN diluée 10 fois et suivre le tableau 2 pour les règles décisionnelles	
+	-	Refaire la PCR, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, des analyses complémentaires ¹ devront être réalisées							

¹ Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou par une analyse par séquençage des amplicons obtenus.

² Valeur de Ct 18S Uni échantillon inférieure ou égale au Ct_{seuil} 18S Uni déterminé au laboratoire

³ Valeur de Ct 18S Uni échantillon supérieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminé au laboratoire

Tableau A2 : PCRs réalisées sur S_{ADN} diluées 10 fois

Test C45		Décision	Test C17		Décision	Test 18S Uni		Décision	Résultat
Puits 1	Puits 2		Puits 1	Puits 2		Puits 1	Puits 2		
+	+	Réaliser le test C17	+	+	Arrêt de l'analyse				<i>P. oryzae</i> lignée <i>triticum</i> détecté : suspicion de présence
+	+	Réaliser le test C17	-	-	Réaliser des analyses complémentaires ¹				
-	-	Réaliser le test 18S Uni				+2	+2	Arrêt de l'analyse	<i>P. oryzae</i> lignée <i>triticum</i> non détecté au seuil de détection de la méthode
-	-	Réaliser le test 18S Uni				-3	-3	Arrêt de l'analyse	Résultat indéterminé⁴
+	-	Refaire la PCR, si de nouveau un seul puits sur les deux génère une valeur positive, des analyses complémentaires ¹ devront être réalisées							

¹ Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou par une analyse par séquençage des amplicons obtenus.

² Valeur de Ct 18S Uni échantillon inférieure ou égale au Ct_{seuil} 18S Uni déterminé au laboratoire

³ Valeur de Ct 18S Uni échantillon supérieure au Ct_{seuil} 18S Uni déterminé au laboratoire

⁴ Si possible, doser la quantité d'ADN afin de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

Bibliographie

Ioos, R., C. Fourrier, G. Iancu and 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(5): 582-590.

Pieck, M. L., Ruck, A., Farman, M. L., Peterson, G. L., Stack, J. P., Valent, B., & Pedley, K. F. (2017). Genomics-based marker discovery and diagnostic assay development for wheat blast. *Plant Disease*, 101(1), 103-109.

Thierry, M., P. Gladioux, E. Fournier, D. Tharreau and R. Ioos (2019). "A Genomic Approach to Develop a New qPCR Test Enabling Detection of the *Pyricularia oryzae* Lineage Causing Wheat Blast." *Plant Disease* 104(1): 60-70.

Thierry, M., A. Chatet, E. Fournier, D. Tharreau and R. Ioos (2020). "A PCR, qPCR, and LAMP Toolkit for the Detection of the Wheat Blast Pathogen in Seeds." *Plants* 9(2): 277.