Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA083- Version 2

Septembre 2026

Détection des espèces européennes d'*Heterobasidion* spp. par la technique de 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 23 juillet 2025"

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

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

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*		2025	Version initiale
v2**	Majeure	2026	Règle de positivité d'un échantillon Amélioration du texte pour apporter plus de clarté

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 09/09/2025 au 23/09/2025 sur le site internet de l'agence.

** La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 16/06/2026 au 17/07/2026 sur le site internet de l'agence

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

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

Laboratoire National de Référence "tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 23 juillet 2025"

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été validée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux. Elle est basée sur des travaux de recherche menés par l'unité concernant le développement et la validation d'oligonucléotides spécifiques (Ioos et al. 2019) et leur utilisation optimisée dans le cadre d'un plan de surveillance financé par le Département de la Santé des Forêts (Beltran and Ioos 2025).

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

Sommaire

Avant-propos **3**
Introduction **5**
Avertissements et précautions de sécurité **6**
1. Objet et domaine d'application **7**
2. Documents de référence **7**
3. Termes, sigles et définitions **7**
4. Principe de la méthode **8**
5. Réactifs **9**
5.1 Eau 9
5.2 Kits d'extraction d'ADN 9
5.3 Oligonucléotides 10
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel 10
5.5 Autres consommables à usage unique 10
5.6 Contrôles et témoins 11
6. Appareillage et matériels **12**
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 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total 15
8.3 Test de détection par PCR en temps réel 15
9. Résultats **17**
9.1 Contrôle de la validité des résultats 17
9.2 Calculs et expression des résultats 18
10. Caractéristiques de performance de la méthode **20**
Bibliographie **23**

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

Introduction

Quatre espèces du complexe de champignons pathogènes forestiers *Heterobasidion annosum sensu lato* (s.l.) sont présentes en Europe : *H. annosum sensu stricto* (s.s.), *H. abietinum* et *H. parviporum* sont des espèces indigènes, tandis que *H. irregulare* est une espèce envahissante non indigène qui n'est actuellement signalée qu'en Italie, mais dont la réglementation est recommandée dans toute l'Europe par l'EPPO.

Ces espèces sont responsables de graves pertes économiques et environnementales, et sont considérées comme des menaces majeures pour les conifères dans l'hémisphère nord. En fonction de l'espèce hôte, les pertes causées par ces *Heterobadision* spp. sont associées soit à la pourriture des racines entraînant la mortalité de l'arbre, soit au développement de la pourriture du bois de cœur dans les racines, le tronc et la tige, ce qui nuit à la qualité du bois et à la stabilité des arbres.

H. annosum s.s. attaque principalement les pins (*Pinus* spp.), bien qu'il puisse également être trouvé sur d'autres hôtes, comme l'épicéa commun (*Picea abies*) et même occasionnellement les feuillus. *H. parviporum* est principalement associé à l'épicéa commun. *H. abietinum* est principalement associé au sapin (*Abies* spp.).

L'espèce *H. irregulare* est d'origine nord-américaine. Elle a été introduite en Europe probablement pendant la Seconde Guerre mondiale. Depuis lors, elle est devenue envahissante, se propageant dans les peuplements de pins et de chênes le long de la côte tyrrhénienne dans le centre de l'Italie, souvent en association avec une mortalité importante chez les pins. Cette espèce est également capable de s'hybrider avec *H. annosum* s.s.

Cette méthode qualitative permet de détecter la présence de chacune de ces quatre espèces dans des tissus ligneux, des carpophores, ou du mycelium par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

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

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

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

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

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

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

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

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Heterobasidion annosum* s.s., *H. abietinum*, *H. parviporum*, et *H. irregulare* dans un échantillon de tissu ligneux, ou à partir d'un carpophore ou à partir de tissus mycéliens par deux tests PCR en temps réel multiplex réalisés simultanément et utilisant des combinaisons d'amorces et de sondes d'hydrolyse spécifiques.

Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter les quatre espèces dans la limite du seuil de détection des techniques employées sans objectif de quantification.

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

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Cette méthode concerne les conifères ou essences feuillues symptomatiques. Peuvent être soumis à analyse des échantillons de tissus lignifiés sous forme de copeaux ou de sciure, ou des carpophores, ou tissus mycéliens.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Sans objet.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Sans objet.

2. Documents de référence

[1] **MOA 022 :** Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

3. Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).

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

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

4. Principe de la méthode

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

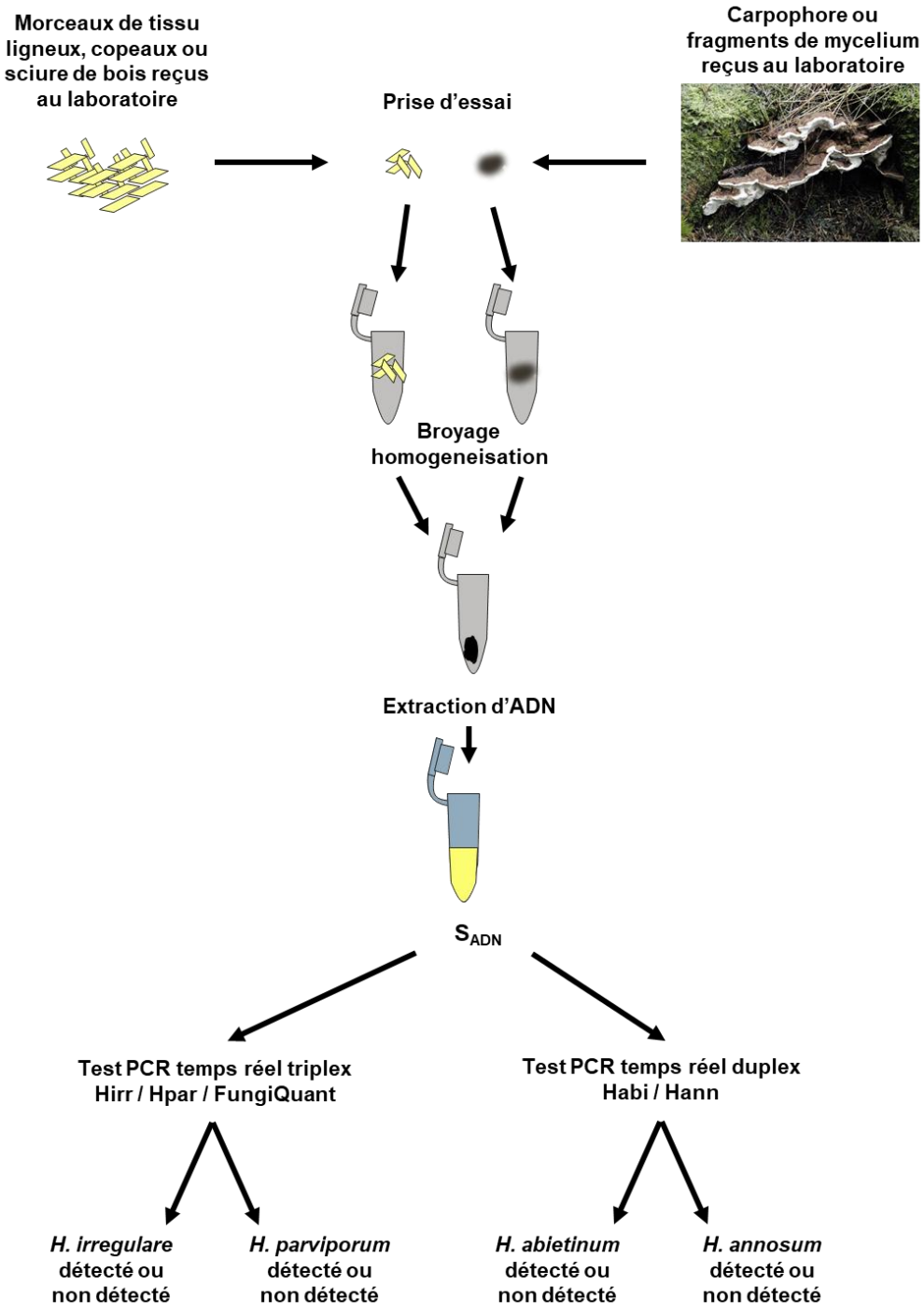

Figure 1: Principe de la méthode de détection des espèces d'*Heterobasidion* spp. basée sur deux tests PCR en temps en triplex et en duplex réalisés en parallèle.

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

5. Réactifs

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

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

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

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

5.2 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal 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 DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), en utilisant le tampon de lyse AP1 fourni par le fabricant (Ioos et al. 2019, Beltran and Ioos 2025).

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

5.3 Oligonucléotides

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

Cible	Amorce ou sonde	Séquence (5' – 3')
H. abietinum	Habi For 4[a]	TCG TTT CAG CCC TTT CCA A
	Habi Rev 14[a]	TTG ATG AAT ATA GTG CGC CTC G
	Habi P 7[a]	Cy5- GG TGC GTC GTC GCC TTC ATT ATT TT-BHQ2
H. annosum s.s.	Hann For 14[a]	CGT CGC CTT AAT GAT TTC ATA AG
	Hann Rev 10[a]	TGT CAC TGT ACT GTT TCT TTA GC
	Hann P 11[a]	FAM-ACC ATA CAY GTT GGC GGG AAC CTC-BHQ1
H. irregulare	Hirr For 1[a]	CGT CGT CTC CAT GAT CTC AA
	Hirr Rev 5[a]	TTG ATG AAT ATA GTG CGC TTC A
	Hirr P 5[a]	JOE-CCA TWC ACG TTG GCG GGA ACC TT-BHQ1
H. parviporum	Hpar For 4[a]	CAA TCG TAT GGG GTC ATT GTA A
	Hpar Rev 6[a]	CAC ATC CGC CAT GTC CC
	Hpar P 8[a]	ROX-GAT CTG CGA GCC CGA CGA ACC G-BHQ2
Toute espèce fongique	FungiQuant-F[b]	GGR AAA CTC ACC AGG TCC AG
	FungiQuant-R[b]	GSW CTA TCC CCA KCA CGA
	FungiQuant-Prb[b]	FAM-TGG TGC ATG GCC GTT-BHQ1

[a] Ioos et al. (2019)
[b] Liu et al. (2012)

D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

5.4 Pré-mix de PCR en temps réel

Le kit d'amplification initialement validé pour cette méthode est le Core kit No ROX (Eurogentec) (Ioos et al. 2019). Un autre kit a été depuis validé, le Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP (Eurogentec), qui remplace le kit initialement validé après l'arrêt définitif de sa production par le fabricant (Beltran and Ioos 2025).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Pointes à filtre stériles à filtre de volume adapté
- Microtubes stériles de 2 mL

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

- 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 ligneux.

5.6 Contrôles et témoins

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

i) l'opérateur a correctement suivi le protocole,

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

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

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

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

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

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteurs sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde FungiQuant (Liu et al. 2012). Ce test sera réalisé en combinaison avec les tests Hirr et Hpar. En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence FungiQuant se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test FungiQuant si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) généré par les deux réplicats est inférieur au Ct_{seuil} FungiQuant, préalablement déterminé expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice dans ses propres conditions. Ce Ct_{seuil} FungiQuant doit être caractérisé par chaque laboratoire dans ses propres conditions.

  Dans les conditions de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test FungiQuant a été déterminée à 26.51 (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 014).

- **Un témoin négatif d'extraction ($T_{extr.}$)** sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide" ($=T_{extr}$), c'est-à-dire un microtube vide de lysing matrix A de 2 mL stérile, subira donc toutes les phases de l'analyse (prise d'essai-broyage-extraction-PCR) pour vérifier l'absence de contamination lors de la prise d'essai et de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif) et sera testé en duplicata 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

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

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 T+ $_{FungiQuant}$** sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR FungiQuant s'est effectuée de façon correcte et que l'ADN est exploitable. Ce T+ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 5.98^10^{-3} ng/µL obtenue à partir d'un échantillon de carpophore d'*Heterobasidion.*

- **Un témoin positif en limite pratique de détection** (**T+$_{LOD}$**) sera systématiquement testé en duplicata lors de chaque réaction de PCR en temps réel, et pour chacune des quatre cibles. 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 *H. annosum s.s., H. abietinum, H. parviporum,* et *H. irregulare* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T+$_{LOD}$ est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels sont insérées la cible de chacun des quatre test PCR en temps réel. Ces T+$_{LOD}$ doivent être caractérisés par chaque laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T+$_{LOD}$ a été ici 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 estimée à :
  - 224 copies plasmidiques de cible pour le test *H. annosum s.s.* par tube de PCR,
  - 178 copies plasmidiques de cible pour le test *H. irregulare* par tube de PCR,
  - 164 copies plasmidiques de cible pour le test *H. parviporum* par tube de PCR,
  - 224 copies plasmidiques de cible pour le test *H. abietium* par tube de PCR

  (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 014).

- **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. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des **S$_{ADN}$** dans les tubes individuels de PCR (2eme type de faux positifs).

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

6. Appareillage et matériels

<u>Avertissement</u> : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des

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

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 », « Cy5 », et « ROX » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research/Qiagen (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 014).
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).

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 tissus ligneux (tronçons, copeaux, ou sciure), de carpophore de champignon, ou de tissus mycéliens. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid positif avant l'envoi.

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.

Fiche de demande d'analyse :

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

Formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 15 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C±3°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 6 mois avant analyse.

7.3 Conservation des 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. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, …) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

Chaque échantillon est traité individuellement et fait l'objet d'une seule prise d'essai. Les prises d'essai se réalisent de préférence sous un poste de sécurité microbiologique permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles et prévenant tout échappement de l'agent pathogène. Le tube faisant office de témoin négatif d'extraction est placé ouvert sur le poste de travail avant la manipulation des échantillons pour prise d'essai et refermé en fin de prélèvement.

- A partir de carottes ou de copeaux de bois, des fragments (maximum d'environ 2 x 2 x 5 mm) sont découpés préférentiellement dans les zones nécrosées si elles sont visibles (biomasse d'*Heterobasidion* spp. plus importante à ces endroits) à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Ces

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

fragments sont ensuite mélangés, pris aléatoirement et transférés dans un microtube de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus plus consommables de broyage) représentant environ 1/4 du microtube.

- A partir de sciure, transférer dans un microtube de lysing matrix A une quantité dont le volume maximal représentera environ 1/4 du microtube.
- A partir de carpophore ou de mycélium, des fragments (maximum d'environ 2 x 2 x 5 mm) sont découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Ces fragments sont ensuite mélangés, pris aléatoirement et transférés dans un microtube de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus plus consommables de broyage) représentant environ 1/4 du microtube.

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

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif d'extraction sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.

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

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

4. Placer le microtube sur le portoir du broyeur FastPrep et broyer environ 1 minute à 6,5 unités. Recommencer cette étape une deuxième fois.

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

6. Incuber chaque tube entre 15 et 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 réhomogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.

7. Suivre ensuite le protocole d'extraction prescrit par le fabricant, après avoir brièvement centrifugé les tubes afin de limiter les risques de projection à leur ouverture.

8. A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total issus de fruits ou de culture pure est élué dans un volume final de 100 µL de tampon d'élution. Cette solution constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution des mélanges réactionnels de détection

La composition de chaque mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 µL) est la suivante :

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

PCR temps réel duplex Habi + Hann :

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel pour la détection d'*H. abietinum* et *H. annosum s.s*.

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP *	1x
Amorce sens Habi For 4	0.3 µM
Amorce antisens Habi Rev 14	0.3 µM
Sonde Habi P 7	0.1 µM
Amorce sens Hann For 14	0.3 µM
Amorce antisens Hann Rev 10	0.3 µM
Sonde Hann P 11	0.1 µM

PCR temps réel duplex Hirr + Hpar + FungiQuant :

Tableau 3 : composition du mélange réactionnel pour la détection d'*H. irregulare, H. parviporum* et FungiQuant.

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µL
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP *	1x
Amorce sens Hirr For 1	0.3 µM
Amorce antisens Hirr Rev 5	0.3 µM
Sonde Hirr P 5	0.1 µM
Amorce sens Hpar For 4	0.3 µM
Amorce antisens Hpar Rev 6	0.3 µM
Sonde Hpar P 8	0.1 µM
Amorce sens FungiQuant-F	1.8 µM
Amorce antisens FungiQuant-R	1.8 µM
Sonde FungiQuant-Prb	0.23 µM

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

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

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 obligatoire d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

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

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

Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel

Les différents paramètres des PCR en temps réel duplex et triplex pour la détection des *Heterobasidion* spp. sont identiques et sont les suivants (Ioos et al. 2019):

Tableau 4 : programme PCR à utiliser pour la réaction duplex et pour la réaction triplex.

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN*	95°C	3 min	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	**40**
3	Hybridation - polymérisation	**65°C**	**55 sec puis mesure de la fluorescence**	

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

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

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

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

a) Aucun des réplicats de $T-_{extr}$ n'a généré de valeur de Ct pour le test cible => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la

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

série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN}.

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

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

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} (prises d'essai et leur réplicats) testés au cours de la même réaction de PCR.

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

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

Les règles décisionnelles sont résumées dans le tableau ci-dessous qui est utilisable pour chacune des quatre espèces d'*Heterobasidion* recherchées :

Tableau 5 : PCR *Heterobasidion* sp. (Habi, Hpar, Hann, Hirr) / FungiQuant réalisées sur S_{ADN}

Test *Heterobasidion* sp.		**Test FungiQuant**		**Décision et résultat**
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	**+**	***n.a.**	***n.a.**	**Arrêt de l'analyse : *Heterobasidion* sp. détecté**
-	-	**+**	**+**	**Arrêt de l'analyse : *Heterobasidion* sp. non détecté au seuil de détection de la méthode**
-	-	-	-	Refaire la PCR multiplex *Heterobasidion sp.*/FungiQuant sur **S_{ADN} diluée 10 fois** et suivre le tableau 6 pour les règles décisionnelles

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

+	-	+	-	Refaire la PCR, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR ***Heterobasidion* sp. cible** en triplicat. A l'issue de ce test, si : ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => ***Heterobasidion* sp.** détecté ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => ***Heterobasidion* sp.** non détecté au seuil de détection de la méthode

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

Tableau 6 : PCR Heterobasidion sp. (Habi, Hpar, Hann, Hirr) / FungiQuant réalisées sur S_{ADN} diluée au 1/10e

Test *Heterobasidion* sp.		**Test FungiQuant**		**Décision et résultat**
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	+	***n.a.**	***n.a.**	**Arrêt de l'analyse : *Heterobasidion* sp. détecté**
-	-	+	+	**Arrêt de l'analyse : *Heterobasidion* sp. non détecté au seuil de détection de la méthode**
-	-	-	-	Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai. **Sinon, arrêt de l'analyse : résultat indéterminé[2]**
+	-	+	-	Refaire la PCR multiplexe, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive, des analyses complémentaires[1] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR ***Heterobasidion* sp.** cible en triplicat. A l'issue de ce test, si : ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct ≤ au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => ***Heterobasidion* sp.** détecté ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct> au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => ***Heterobasidion* sp.** non détecté au seuil de détection de la méthode

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

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

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

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

10. Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « Autres champignons sur toutes matrices » sous la référence MIAM 014 est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7 : synthèse des caractéristiques de performance

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	Les valeurs R2 pour *H. abietinum*, *H. annosum* s.s., *H. irregulare* et *H. parviporum* étaient toutes de 0,99, tandis que l'efficacité de la PCR (% E) calculée à partir de la pente variait entre 94,0 % et 100,1 %.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 112, 112, 88 et 82 copies plasmidiques d'ADN cible pour respectivement *H. abietinum*, *H. annosum* s.s., *H. irregulare* et *H. parviporum*. .
Spécificité analytique	La spécificité des tests a été vérifiée avec un large panel d'ADN provenant d'espèces cibles et non cibles, et des résultats similaires ont été obtenus avec des tests PCR en temps réel réalisés en multiplex et en simplex (cf Ioos et al. (2019)). Les tests ciblant *H. annosum* s.s., *H. irregulare* et *H. parviporum* ont donné des résultats positifs avec l'ADN de toutes les souches cibles incluses dans l'étude (respectivement 33, 14 et 29 souches testées), confirmant ainsi leur inclusivité et leur spécificité.
Inclusivité	Cf spécificité analytique
Répétabilité et reproductibilité	

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

Table 3 Repeatability (variability of C_t values within a single run) and reproducibility (variability of C_t values between different runs) for the *Heterobasidion* real-time assays in duplex for *H. abietinum*/*H. annosum* s.s. and in triplex for *H. irregulare*/*H. parviporum*/FungiQuant

Target	Concentration of DNA included in each reaction	Intra-assay		Inter-assay	
		Mean C_t ± SD[a]	CV (%)	Mean C_t ± SD	CV (%)
H. abietinum	1 ng μL^{-1} gDNA[b]	31.5 ± 0.4	0.5	31.7 ± 1.1	3.5
	100 × LOD[c]	28.3 ± 0.1	0.1	28.4 ± 0.5	1.7
	10 × LOD	30.5 ± 0.2	0.3	32.1 ± 0.9	2.8
H. annosum	1 ng μL^{-1} gDNA[d]	22.9 ± 0.5	2.8	22.5 ± 0.7	3.1
	100 × LOD	25.4 ± 0.2	2.0	25.8 ± 0.4	1.7
	10 × LOD	29.7 ± 0.5	2.2	29.2 ± 0.8	2.7
H. irregulare	1 ng μL^{-1} gDNA[e]	19.9 ± 0.6	3.2	19.5 ± 0.1	0.3
	100 × LOD	23.2 ± 0.4	1.6	22.6 ± 0.3	1.2
	10 × LOD	25.9 ± 0.3	1.2	25.4 ± 0.8	3.2
H. parviporum	1 ng μL^{-1} gDNA[f]	17.7 ± 0.3	1.5	17.7 ± 0.2	1.1
	100 × LOD	21.1 ± 0.2	1.2	21.0 ± 0.5	2.6
	10 × LOD	24.4 ± 0.1	0.4	24.2 ± 0.1	0.5

[a]The mean C_t value and standard deviation were calculated with 10 replicates.
[b]*H. abietinum* 17/058. Increased C_t values were observed for this strain, probably due to degradation of DNA over time.
[c]LOD (limit of detection) corresponds to 112, 112, 88 and 82 of plasmid copies μL^{-1} for *H. abietinum*, *H. annosum*, *H. irregulare* and *H. parviporum*, respectively.
[d]*H. annosum* s.s. LSVM1138.
[e]*H. irregulare* 38NA.
[f]*H. parviporum* LSVM1155.

Extrait de loos et al. (2019)

La répétabilité et reproductibilité qualitative des tests sont à 100%

Robustesse

Le tableau ci-dessous présente les résultats de robustesse de la sensibilité à une concentration proche de la limite de détection (variation de volume réactionnel et du volume d'ADN matrice)

La robustesse qualitative des tests est à 100%

Supplementary Table 2: Evaluation of robustness of the *Heterobasidion* real-time assays using mean Ct values.

Target	Concentration	DNA template volume [a]			Reaction volume [a]			Hybridization temperature [a]		
		1.8 µL	2 µL	2.2 µL	18 µL	20 µL	22 µL	63°C	65°C	67°C
H. abietinum	100× LOD	29.9^{e}	27.7^{c}	25.6^{a}	27.9^{c}	28.2^{c}	27.8^{c}	28.4^{c}	27.0^{b}	29.2^{d}
	10× LOD	29.4^{a}	30.4^{ab}	32.1^{cd}	32.0^{cd}	32.1^{cd}	32.9^{d}	31.1^{bc}	30.1^{ab}	32.9^{d}
	1 ng μL^{-1} gDNA[c]	30.4^{ab}	31.6^{c}	30.1^{a}	31.1^{ac}	31.1^{bc}	30.8^{ac}	30.0^{a}	30.2^{a}	33.4^{d}
H. annosum s.s.	100× LOD	24.7^{bc}	22.4^{a}	24.2^{b}	24.9^{bd}	25.2^{cd}	26.0^{e}	25.1^{cd}	25.5^{d}	28.3^{f}
	10× LOD	26.2^{a}	29.1^{de}	26.8^{ab}	29.7^{e}	29.2^{de}	29.9^{e}	27.8bc	28.3cd	30.8f
	1 ng μL^{-1} gDNA[d]	22.3^{c}	21.8^{b}	23.3^{d}	22.3^{c}	22.2^{c}	22.5^{c}	21.1^{a}	22.2^{c}	25.7^{e}
H. irregulare	100× LOD	22.5^{bc}	22.5^{bc}	22.1^{a}	23.0^{d}	22.6^{c}	23.8^{e}	22.1^{ab}	22.5^{bc}	22.7^{bc}
	10× LOD	25.3^{b}	25.4^{b}	25.2^{b}	24.6^{a}	24.6^{a}	24.8^{a}	25.4^{b}	25.2^{b}	25.5^{b}
	1 ng μL^{-1} gDNA[e]	19.8^{cd}	20.4^{e}	19.7^{cd}	19.3^{abc}	19.0^{a}	19.6^{bd}	19.1^{ab}	19.0^{ab}	20.0^{de}
H. parviporum	100× LOD	23.1^{c}	21.8^{e}	20.7^{b}	21.4^{d}	21.5^{d}	21.7^{e}	20.2^{a}	20.3^{a}	20.7^{b}
	10× LOD	24.9^{e}	24.9^{e}	24.6^{d}	24.4^{c}	24.6^{cd}	24.5^{d}	23.4^{a}	23.9^{b}	23.8^{b}
	1 ng μL^{-1} gDNA[f]	19.2^{f}	19.9^{g}	18.8^{e}	17.4^{de}	17.5^{bc}	17.8^{de}	17.4^{ab}	17.3^{a}	17.6^{cd}

[a] Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different according to Tuckey's test (p >0.01)
[b] LOD (Limit Of Detection) corresponds to 112, 112, 82 and 88 of pc per PCR reaction for *H. abietinum*, *H. annosum s.s.*, *H. irregulare*, and *H. parviporum*, respectively.
[c] *H. abietinum* strain 17/058
[d] *H. annosum* s.s. strain LSVM1138
[e] *H. irregulare* strain 38NA
[f] *H. parviporum* strain LSVM1155

Extrait de loos et al. (2019)

Sensibilité relative

Ces critères n'ont pas été évalués de façon expérimentale par le laboratoire.

Spécificité relative

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

Exactitude relative	
Autres critères :	Non évalué
Autres critères : *Durée d'analyse*	Durée de la nouvelle méthode : 1 journée

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

Bibliographie

Beltran, A. & R. Ioos. 2025. FOMES 2025: Amélioration de la détection et du suivi des mortalités associées aux Heterobasidion spp. et Coniferiporia sulphurascens en forêt de résineux. ed. DSF, 17. Rapport Technique de projet.

Ioos, R., P. Chrétien, J. Perrault, C. Jeandel, C. Dutech, P. Gonthier, F. Sillo, A. M. Hietala, H. Solheim & J. Hubert (2019) Multiplex real-time PCR assays for the detection and identification of Heterobasidion species attacking conifers in Europe. *Plant Pathology,* 68**,** 1493-1507.

Liu, C. M., S. Kachur, M. G. Dwan, A. G. Abraham, M. Aziz, P.-R. Hsueh, Y.-T. Huang, J. D. Busch, L. J. Lamit, C. A. Gehring, P. Keim & L. B. Price (2012) FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology,* 12**,** 255.

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