Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA084 - Version 1

Septembre 2026

Détection de *Bretziella fagacearum* par PCR en temps réel

Laboratoire de la santé des végétaux

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

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

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

Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v1*	Sans objet	2026	Version initiale

* La version 1 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 adaptée par :

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

Laboratoire de Référence de l'Union Européenne Fungi and oomycetes

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, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

Les échantillons naturellement contaminés ainsi que de nombreux isolats fongiques ayant permis de valider cette méthode ont été fournis par le laboratoire de pathologie forestière de l'université du Michigan, USA.

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

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 **8**
4. Principe de la méthode **8**
5. Réactifs **9**
5.1 Eau 9
5.2 Kits d'extraction d'ADN 9
5.3 Oligonucléotides 9
5.4 Pré-mix de PCR en temps réel 10
5.5 Autres consommables à usage unique 10
5.6 Contrôles et témoins 10
6. Appareillage et matériels **12**
7. Échantillons **13**
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons 13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse 14
7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés : 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 16
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 **20**
Bibliographie **25**
Annexe 1 - Diagramme décisionnel **26**

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

Introduction

Bretziella fagacearum est l'agent responsable du flétrissement du chêne. *B. fagacearum* est un agent de trachéomycose (dégénérescence du système vasculaire) provoquant de graves dépérissements aux Etats-Unis et au Canada. Les arbres atteints sont a priori reconnaissables par leur feuillage clairsemé et jaunâtre, ainsi que par le dépérissement d'une ou plusieurs branches. L'incidence et la gravité de la maladie varient selon les régions et les espèces. Une fois infectées, certaines essences meurent en moins d'un an, particulièrement les chênes rouges (section Lobate) qui peuvent succomber dans les quatre à six semaines après l'infection. Les chênes blancs américains (section Quercus) sont plus résistants à la maladie que les chênes blancs européens (*Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus pubescens*). Par ailleurs, *B. fagacearum* a également été détecté sur différentes espèces de châtaigniers.

Le parasite se transmet d'arbre en arbre par les anastomoses racinaires et par le biais d'insectes vecteurs, notamment *Colopterus truncatus* et *Carpophilus sayi* (Nitidulidae).

En 2022, Bourgault et *al*. ont publié une méthode de détection de *B. fagacearum* basée sur la PCR en temps réel avec l'utilisation d'une sonde d'hydrolyse. Cette méthode a fait l'objet d'une validation par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE), dont le rapport est disponible à l'adresse suivante https://eurl-fungi.anses.fr/.

L'objet de cette méthode est la détection de *Bretziella fagacearum* dans des tissus ligneux et les pétioles de *Quercus* spp., *Castanea* spp. et à partir de culture pure. La présence de *Bretziella fagacearum* est mise en évidence par la technique de PCR temps réel.

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

Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

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

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

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

1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Bretziella fagacearum* dans les parties sous-corticales des branches de *Quercus* spp. et *Castanea* spp. présentant des symptômes ou à partir de culture pure. La présence de *B. fagacearum* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel utilisant une combinaison d'amorces et de sondes d'hydrolyse. Cette méthode est qualitative : elle permet de détecter *B. fagacearum* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *B. fagacearum* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse :
Cette méthode a été initialement validée sur des cultures pures de *B. fagacearum* ainsi que sur de la sciure, des copeaux de bois ou des pétioles issus de chênes infectés (voir dossier de validation du LRUE – LSV Unité de mycologie document MIAM019). Cette méthode peut être également appliquée sur des échantillons issus de châtaigniers, **en veillant cependant à la bonne qualité de l'ADN extrait de ces échantillons**.

Type de prélèvement :
Le prélèvement est effectué sur des arbres en cours de flétrissement présentant des symptômes caractéristiques de ceux provoqués par *B. fagacearum* et peut être réalisé à deux endroits :

- Sur les rameaux dans la partie flétrie du houppier présentant des décolorations de feuilles : sectionner les branches (minimum 3 cm de diamètre et 15 cm de long) à l'aide de sécateurs ou de coupe-branches préalablement désinfectés.
- Sur le tronc d'arbre flétri : prélever au niveau de fentes verticales à l'aide d'un ciseau à bois ou d'une hache désinfectés.

Le tout doit être conditionné dans un sachet plastique épais ou dans un flacon plastique à usage unique (Annexe 1). Le conditionnement doit être parfaitement étanche, afin d'éviter la perte ou la dissémination d'échantillon au cours du transport.

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] **MOA GLO 001** : glossaire général et technique en vigueur au LNPV.

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

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.

4. Principe de la méthode

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

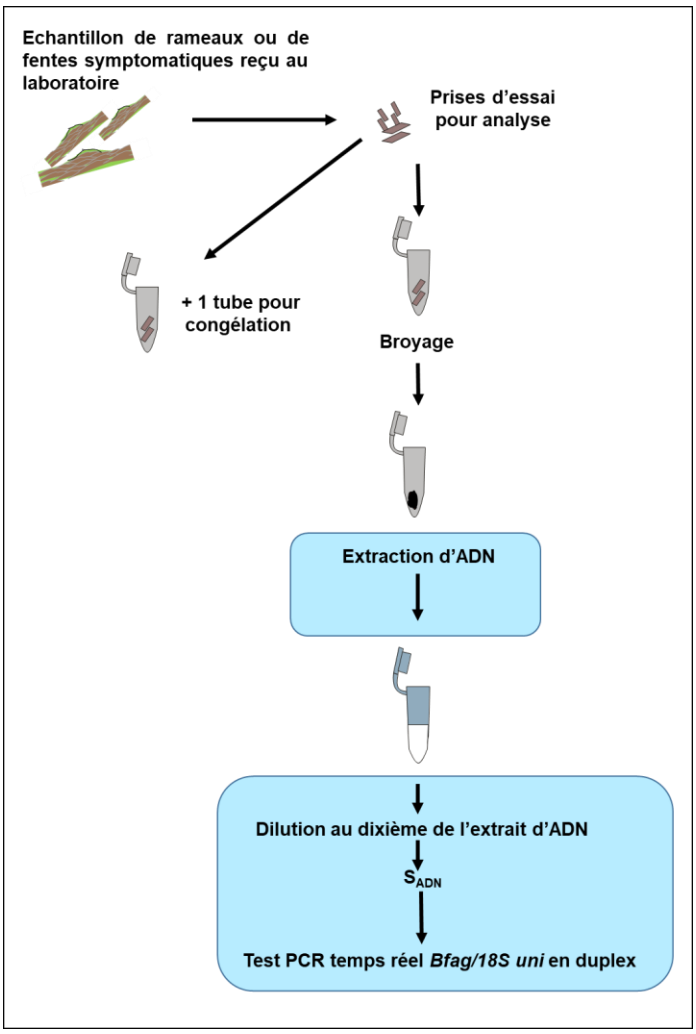


Figure n° 1 : Principe de la méthode

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

5. Réactifs

<u>Avertissement</u> : 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. Les résultats originaux de validation sont disponibles dans le dossier de validation MIAM 019 du LRUE – LSV unité de mycologie.

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 présents dans 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 fourni par le fabricant.

5.3 Oligonucléotides

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

Test	Cible	Amorces et sonde	Séquence (5'-3')
Bfag[1]	*B. fagacearum*	Cfag ITS F 75–97 Cfag ITS R2 215–43 Cfag ITS T RC 126–50	TAAAACCATTTGTGAACATACCA TGAAAGTTTTAACTATTTTGTTAAATGCA **FAM**-AACATCCCCTGAAGAAAGAAGTCC-**BHQ1**
18S uni[2]	ADN de plante / fongique	18S uni-F 18S uni-R 18S uni-P	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA CCACCACCCATAGAATCAAGA **JOE**-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT- **BHQ1**

[1]Bourgault et al., (2022)
[2]Ioos et al, (2009)

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

Les amorces et sondes initialement validées pour cette méthode ont été synthétisées par Eurogentec. 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

Plusieurs kits d'amplification ont été validés pour cette méthode :

- Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP (Eurogentec)
- Takyon No Rox Probe Core Kit blue dTTP (Eurogentec)
- Luna Universal Probe Master mix (NE BioLabs)
- Maxima Probe (ThermoFisher)
- Taqman Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems)

5.5 Autres consommables à usage unique

- Pointes à filtre stériles de volume adapté
- 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 ligneux.
- 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.

5.6 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 des solutions utilisées étaient corrects,

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

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 18S uni-F/-R/-P (Ioos et al. 2009). Ce test sera réalisé en combinaison avec le test Cp. En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une solution d'ADN (S_{ADN}) sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré par les deux réplicats est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice dans ses propres conditions. Ce Ct_{seuil} 18S uni doit être caractérisé par chaque laboratoire dans ses propres conditions.

  Dans les conditions de validation de ce test et pour des échantillons de bois de *Quercus* spp., le Ct_{seuil} 18S uni a été déterminé à 15,90 (correspond à la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni).

- **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 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 d'amplification plante (T+ $_{18S\ Quercus}$)** sera systématiquement testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce T+ est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique dosée à 20 ng/µL obtenue à partir d'un échantillon de chêne.

- **Un témoin positif d'amplification en limite pratique de détection** (**T+$_{LOD}$**) sera systématiquement testé en deux réplicats lors de chaque réaction de PCR en temps réel. 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 *B. fagacearum* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T+$_{LOD}$ est

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

constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est insérée la cible du test PCR Bfag. Ce $T+_{LOD}$ doit être caractérisé 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 LRUE, la limite de détection du test Bfag a été estimée à 200 copies plasmidiques de cible par tube de PCR.

- **Un témoin négatif d'amplification** (**T-** ou **NTC,** no template control) sera systématiquement introduit en deux réplicats 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 $\mathbf{S_{ADN}}$ dans les tubes individuels de PCR (2^{eme} type de faux positifs).

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

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 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 » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research/Qiagen.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type FastPrep, MP Biomedicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre

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

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).
- Centrifugeuse de paillasse équipée d'un rotor pouvant recevoir des microtubes de 1,5 et 2 mL

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 tissus ligneux de chêne présentant des symptômes (cf. Annexe 1). Un échantillon doit représenter au minimum un rameau et/ou une section de bois.

Les outils utilisés sur le terrain sont désinfectés avant et après chaque prélèvement.
La désinfection peut se faire :

- par trempage dans de l'éthanol à 70% ou à brûler, suivi d'un flambage,
- par trempage dans de l'eau de Javel du commerce ou une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl), diluée et titrée à au moins 1% de Chlore actif, suivi d'un essuyage pour éliminer le désinfectant.

Les échantillons peuvent également être constitués d'une culture fongique.

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 du prélèvement, ils doivent être conservés au froid positif jusqu'à l'envoi dans un délai maximal de 7 jours.

Confection du colis :

Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique (tube ou sachet plastique épais) 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 de type « quarantaine phytosanitaire » doit figurer à l'extérieur du colis.

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

Fiche de demande d'analyse :

Formulation claire de la demande, 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

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 avant analyse (cf. Annexe 2).

7.3 Conservation des reliquats d'échantillons utilisés :

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

Chaque échantillon est traité individuellement et fait l'objet d'une seule prise d'essai. La prise d'essai se réalise 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 ($T\text{-}_{extr}$) est placé ouvert sur le poste de travail avant la manipulation des échantillons pour prise d'essai et refermé en fin de prélèvement.

- **Tissus ligneux :**

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

A cette étape, il est recommandé de préparer, si possible, un tube supplémentaire contenant le reliquat de fragments, 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 rameau(x), enlever l'écorce à l'aide d'un couteau ou d'une lame de scalpel stérile, puis découper des fragments (si possible inférieurs à 5 mm dans toutes les dimensions) préférentiellement dans les zones nécrosées si elles sont visibles (biomasse de *B. fagacearum* plus importante à ces endroits). Ces fragments sont ensuite mélangés, pris aléatoirement et transférés dans un microtube de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus + consommables de broyage) représentant environ 1/4 du microtube.
- A partir de section(s) de bois, découper des fragments (si possible inférieurs à 5 mm dans toutes les dimensions) préférentiellement dans les zones nécrosées si elles sont visibles (biomasse de *B. fagacearum* plus importante à ces endroits). Ces fragments sont ensuite mélangés, pris aléatoirement et transférés dans un microtube de Lysing matrix A, jusqu'à un volume final (tissus + consommables de broyage) représentant environ 1/4 du microtube.

➢ **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.

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

Le tube faisant office de témoin négatif d'extraction ($T\text{-}_{extr}$) sera ouvert en premier et refermé en dernier, cela à chaque étape pendant laquelle les tubes d'échantillons doivent être ouverts.

1. 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.

2. 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, fournie avec le kit d'extraction. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant.

3. Placer les microtubes sur le portoir du broyeur FastPrep et broyer environ 1 minute à 6,5 m/s. Laisser reposer 5 minutes, puis recommencer cette étape une deuxième fois.

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

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

5. Incuber les microtubes 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 microtube à au moins une reprise pour homogénéiser son contenu qui aura tendance à sédimenter.

6. A la fin de l'incubation centrifuger les microtubes environ 5 min à une accélération supérieure ou égale à 20 000 g. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.

7. 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.

8. A 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'élution. **Ces solutions d'ADN sont ensuite diluées au dixième afin d'être analysées par PCR en temps réel (S_{ADN})**.

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection

La composition des mélanges réactionnels (volume réactionnel final de 20 µL) est la suivante :

PCR temps réel duplex Bfag/18S uni :

Tableau 2 : composition du mélange réactionnel Bfag/18S uni

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp volume réactionnel final
Takyon No Rox Probe MasterMix blue dTTP	1x
Amorce sens Cfag ITS F 75–97	0.6 µM
Amorce antisens Cfag ITS R2 215–43	0.6 µM
Sonde Cfag ITS T RC 126–50	0.1 µM
Amorce sens 18S uni-F	0.3 µM
Amorce antisens 18S uni-R	0.3 µM
Sonde 18S uni-P	0.1 µM

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL.
2. Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.

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

3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de pointes à filtre stériles.
4. Le microtube contenant le 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.

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

1. La solution S_{ADN} est testée en deux réplicats (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µL par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie de pointe à filtre stérile.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en deux réplicats : $T-_{extr}$, $T+_{LOD}$, 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 de la PCR en temps réel pour la détection de *B. fagacearum* sont les suivants :

Tableau 3 : programme PCR

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	60°C	90 sec puis mesure de la fluorescence	

*à adapter selon les recommandations du fournisseur de la polymérase ADN

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

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

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 série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, sa distribution 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, sa distribution 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 *B. fagacearum*.

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 une 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} testées 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$_{LOD}$) 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 Bfag.
- Un réplicat d'un extrait d'ADN testé dont le Ct généré est inférieur ou égal à la valeur de Ct 18S Uni maximale déterminée expérimentalement par le laboratoire est considéré comme positif pour le test 18S Uni.

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

Les règles décisionnelles sont résumées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 4: PCR duplex Bfag/18S uni réalisées sur S_{ADN}

Test Bfag		Test 18S uni		Décision et résultat
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
+	+	n.a.*	n.a.	**Arrêt de l'analyse : *B. fagacearum* détecté**
-	-	+	+	**Arrêt de l'analyse : *B. fagacearum* 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**[1]
+	-	+	-	Refaire le test PCR duplex Bfag/18S uni, si de nouveau un seul réplicat sur les deux génère une valeur positive pour les deux tests, des analyses complémentaires[2] devront être entreprises par le LNR
+	-	+	+	Refaire uniquement la PCR Bfag 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 **=> *B. fagacearum*** détecté ▪ Au moins 2 réplicats sur 3 ont un Ct > au Ctmoy $_{LOD}$, alors arrêt de l'analyse => ***B. fagacearum*** non détecté au seuil de détection de la méthode

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

Un diagramme décisionnel simplifié (ne prenant pas en compte les règles à suivre en cas d'amplification pour un seul puits du réplicat) et résumant ces conditions est présenté en annexe 1.

[1] 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).

[2] Les analyses complémentaires peuvent par exemple consister en une analyse par PCR temps réel ou conventionnelle ciblant des marqueurs différents, ou en une analyse par séquençage de l'amplicon obtenu.

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

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR « tous champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023 » sous la référence MIAM 019.

Tableau 8 : synthèse des caractéristiques de performance

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR temps réel	L'efficacité de la réaction du test Bfag sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE (1X) a été évaluée à **96%** (**R^2=0.9991**) en monoplex. L'efficacité de la réaction de PCR du test Bfag sur la même gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans de l'ADN de chêne (10 ng/µL) a été évaluée à **97%** (**R^2=0.9992**) en duplex.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été évaluée à partir d'une gamme de solution d'ADN plasmidique diluée dans du TE 1X. Pour le test Bfag, la sensibilité a été estimée à 200 copies plasmidiques (cp) par tube de PCR.
Exclusivité	L'exclusivité du test a été évaluée *in vitro* sur 71 souches d'espèces fongiques proches phylogénétiquement ou fréquemment retrouvées dans la même niche écologique que *B. fagacearum*. Toutes ces souches ont montré une qualité d'ADN amplifiable avec le test développé par White et al, 1990 basé sur l'amplification de l'ITS. Le test montre une spécificité de 100% avec les souches testées.
Inclusivité	L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontré *in vitro* sur 24 souches de *Bretziella fagacearum* de différentes provenances géographiques. Le test montre une inclusivité de 100% avec les souches testées.
Répétabilité et reproductibilité	La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, sur 10 réplicats d'ADN extrait de deux échantillons de chêne artificiellement contaminés par des endoconidies de *B. fagacearum* à deux niveaux d'infection différents, et sur 10 réplicats d'ADN extrait à partir de 6 cultures pures non-cibles.

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

Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Répétabilité

Sample/Starting material	Concentration	Mean Ct	SD	CV (%)
Plasmid in TE buffer	10xLOD	30.81	0.18	0.58
Plasmid in TE buffer	100xLOD	27.16	0.09	0.33
Endoconidia + sapwood[a]	10,000	24.32	0.09	0.37
Endoconidia + sapwood[a]	1,000,000	17.56	0.12	0.68
Thielaviopsis paradoxa (LSVM33)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/
Ceratocystis platani (LSVM173)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/
Cladosporium sphaerospermum (LSVM464)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/
Cladosporium cladosporioides (LSVM1022)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/
Cladosporium sp. (LSVM1105)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/
Chalaropsis thielavioides (LSVM1495)	1 ng μL^{-1}	Negative	/	/

a. Sapwood was obtained by drilling branches of an asymptomatic *Quercus rubra* and spiked with 100 µL of endoconidia adjusted to the desired concentration. All samples that contained the target were positive.

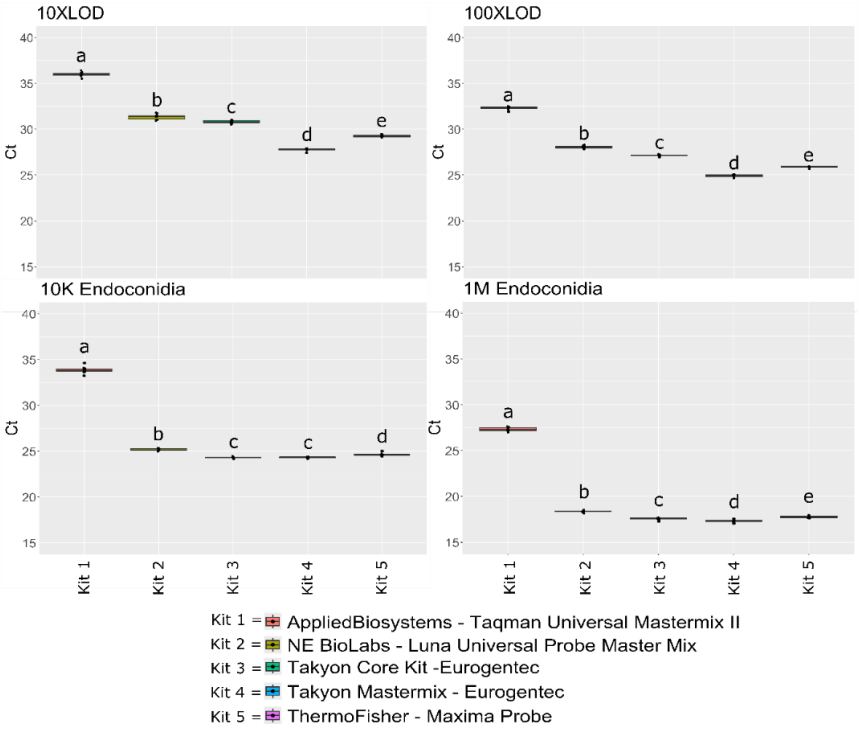
Reproductibilité

Starting Material	Concentration	Mean Ct	SD	CV (%)
Plasmid in TE	10xLOD	30,42	0,42	1,39
Plasmid in TE	100xLOD	28,08	0,24	0,84
Endoconidies EURL115 + sapwood	1.10^4	24,13	0,22	0,90
Endoconidies EURL115 + sapwood	1.10^6	17,49	0,20	1,14
Thielaviopsis paradoxa (LSVM33)	1ng/µL	Neg	/	/
Ceratocystis platani (LSVM173)	1ng/µL	Neg	/	/
Cladosporium sphaerospermum (LSVM464)	1ng/µL	Neg	/	/
Cladosporium cladosporioides (LSVM1022)	1ng/µL	Neg	/	/
Cladosporium sp. (LSVM1105)	1ng/µL	Neg	/	/
Chalaropsis thielavioides (LSVM1495)	1ng/µL	Neg	/	/

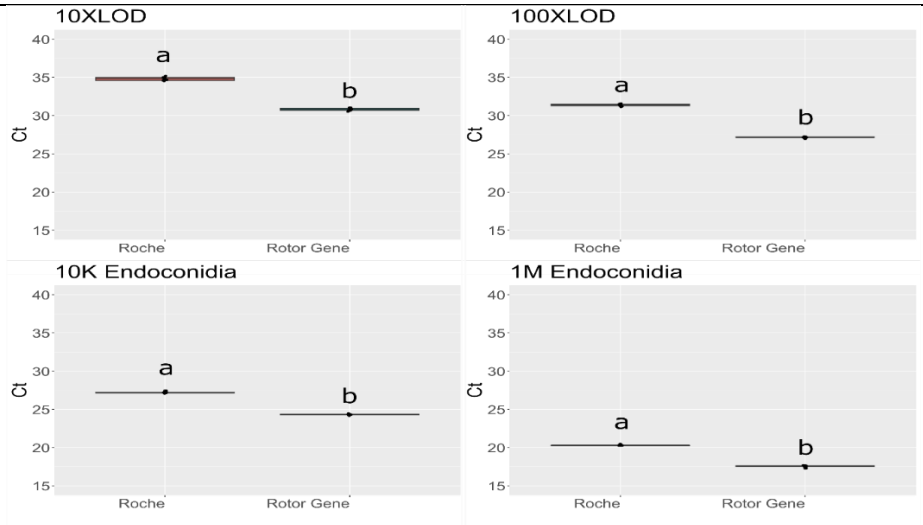
La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variation sont tous inférieurs à 10 %.

Le test est donc jugé répétable et reproductible.

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

Transférabilité	La transférabilité a été évaluée en utilisant 5 kits d'amplification enzymatiques différents provenant de 4 fournisseurs et sur 2 plateformes PCR différentes. Pour cela, 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, 10 réplicats d'ADN extrait de deux échantillons de chêne artificiellement contaminés par des endoconidies de *B. fagacearum* à deux niveaux d'infection différents, et 10 réplicats d'ADN extrait à partir de 6 cultures pures non-cibles ont été utilisés. Les résultats sont représentés sur les figures ci-dessous : **Kits PCR :**  **Plateformes PCR :**

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



Les cultures pures non-cibles n'ont généré aucune valeur de Ct.
Les échantillons cibles ont généré des valeurs de Ct, quel que soit le kit d'amplification enzymatique, ou la plateforme de PCR utilisés.

Le test est donc jugé transférable.

Robustesse

La robustesse a été testée en faisant varier la température d'hybridation de ± 2°C et en faisant varier le volume réactionnel de ± 10 %. Pour cela, 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée, dosée à 2 concentrations proches de la LOD, 10 réplicats d'ADN extraits à partir de deux échantillons de chêne artificiellement contaminés par des endoconidies de *B. fagacearum* à deux niveaux d'infection différents, et 10 réplicats d'ADN extraits à partir de 4 cultures pures non-cibles ont été utilisés.
Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Sample/Starting material	58°C			60°C			62°C		
	Mean Ct	SD	CV (%)	Mean Ct	SD	CV (%)	Mean Ct	SD	CV (%)
Plasmid in TE Buffer 10xLOD	30.43 [a]	0.12	0.39	30.81 [b]	0.18	0.58	29.5 [c]	0.18	0.61
Plasmid in TE Buffer 100xLOD	27.25 [a]	0.09	0.33	27.16 [a]	0.09	0.33	26.33 [b]	0.07	0.27
10,000 endoconidia + sapwood	24.53 [a]	0.27	1.10	24.32 [a]	0.09	0.37	24.02 [a]	0.06	0.25
1,000,000 endoconidia + sapwood	17.65 [a]	0.10	0.57	17.56 [a]	0.12	0.68	17.39 [b]	0.05	0.29
Thielaviopsis paradoxa (LSVM33)	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
Ceratocystis platani (LSVM173)	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
Cladosporium sphaerospermum (LSVM464)	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
Cladosporium cladosporioides (LSVM1022)	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/

Note: [a,b,c] different letters indicate statistical differences. All samples that contained the target were positive.

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

En faisant varier la température d'hybridation de ±2°C, le test reste robuste avec 100% de résultats positifs pour les solutions ou souches cibles (attendues positives) et 100% de résultats négatifs avec les solutions ou souches non-cibles (attendues négatives).

Sample/Starting material	18 µL			20 µL			22 µL		
	Mean Ct	SD	CV (%)	Mean Ct	SD	CV (%)	Mean Ct	SD	CV (%)
Plasmid in TE Buffer 10xLOD	31.20 [a]	0.26	0.83	30.81 [a]	0.18	0.58	30.99 [b]	0.25	0.81
Plasmid in TE Buffer 100xLOD	27.15 [a]	0.08	0.29	27.16 [a]	0.09	0.33	27.32 [a]	0.10	0.37
10,000 endoconidia + sapwood	24.16 [a]	0.15	0.62	24.32 [a]	0.09	0.37	24.37 [a]	0.06	0.25
1,000,000 endoconidia + sapwood	17.31 [a]	0.08	0.46	17.56 [a]	0.12	0.68	17.73 [a]	0.05	0.28
***Thielaviopsis paradoxa* (LSVM33)**	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
***Ceratocystis platani* (LSVM173)**	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
***Cladosporium sphaerospermum* (LSVM464)**	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/
***Cladosporium cladosporioides* (LSVM1022)**	Negative	/	/	Negative	/	/	Negative	/	/

Note: [a,b,c] different letters indicate statistical differences. All samples that contained the target were positive.

En faisant varier les volumes de mix réactionnel, le test reste robuste, avec 100% de résultats conformes au statut attendu (positif ou négatif).

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

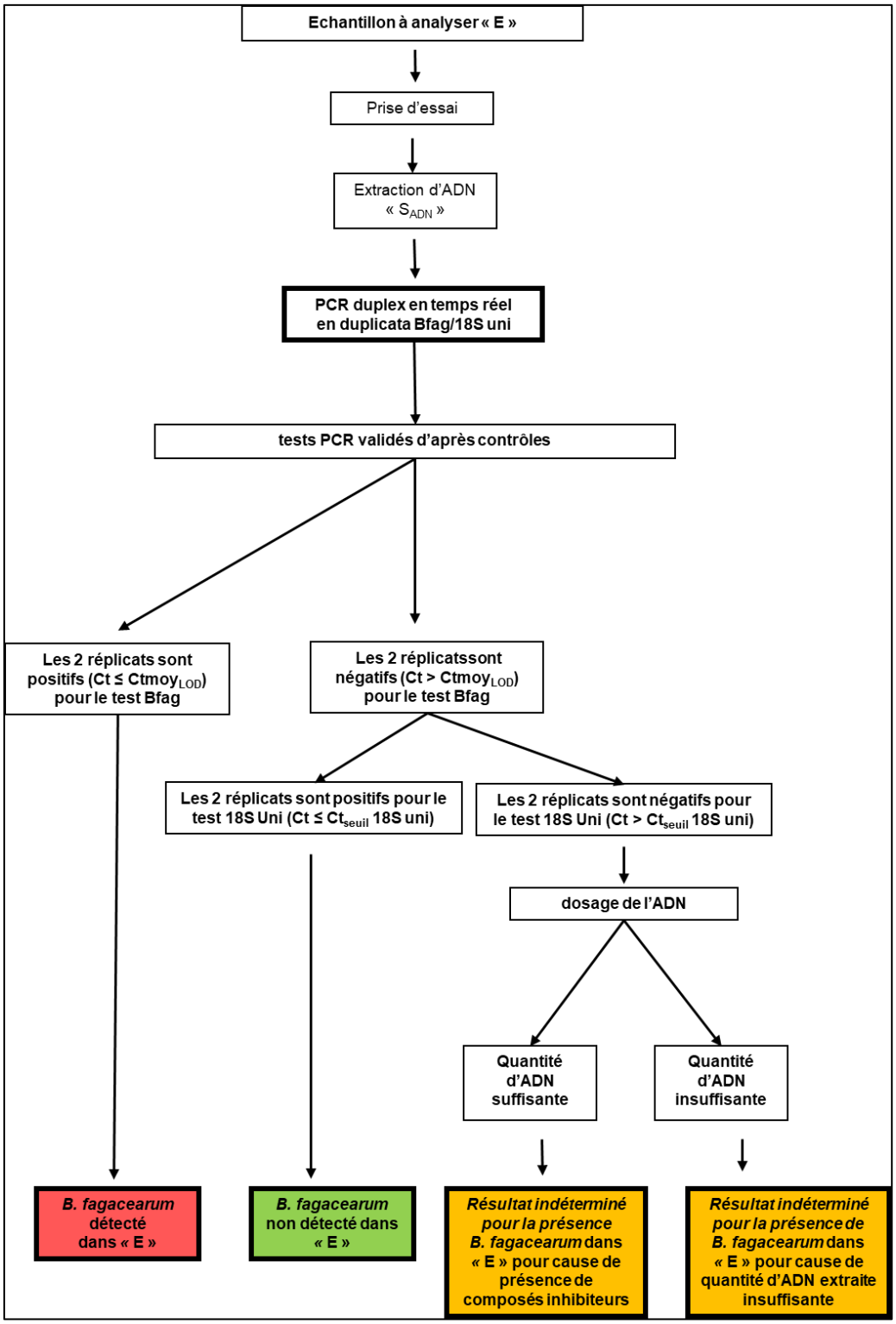
Bibliographie

Ioos, R., C. Fourrier, G. Iancu & T. R. Gordon (2009) Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. *Phytopathology,* 99**,** 582-590.

Bourgault É, Gauthier MK, Potvin A, Stewart D, Chahal K, Sakalidis M, P. Tanguay (2022) Benchmarking a fast and simple on-site detection assay for the oak wilt pathogen *Bretziella fagacearum*. Front. For. Glob. Change 5 :1068135. doi: 10.3389/ffgc.2022.1068135.

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

Annexe 1 - Diagramme décisionnel



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