

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA002- Version 2

Février 2018

Détection de *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* et *Lecanosticta acicola* par PCR en temps réel quadruplex



Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »

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.



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
v1a		mars 2010	Version initiale
v1b	mineures	mai 2014	passage de l'analyse en <i>triplicata</i> à l'analyse en <i>duplicata</i> des extraits d'ADN
V2 *	majeures	février 2018	<ul style="list-style-type: none">• Changement de format de présentation de la méthode• Mise à jour des règles de décision et de leur présentation• Changement du seuil de positivité d'un réplicat de PCR pour la cible

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du public du 20 septembre 2017 au 5 novembre 2017 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 Champignons phytopathogènes sur toute matrice

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 le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) et l'UMR 1136 de l'INRA de Champenoux visant à mettre au point une technique moléculaire de détection des champignons *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* et *Lecanosticta acicola* (Ioos *et al.*, 2010).

La présente méthode a été mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV et a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Eau	9
5.2 Kits d'extraction d'ADN	9
5.3 Oligonucléotides	10
5.4 Kit de PCR en temps-réel	10
5.5 Autres consommables à usage unique	10
5.6 Contrôles et témoins	10
6. Appareillage et matériels	12
7. Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	13
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	14
8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex	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	18
Annexe 1 : Symptômes de la maladie des bandes rouges et des taches brunes	21
Annexe 2 : Tables décisionnelles	23
Bibliographie	25



Introduction

Lecanosticta acicola (Thümen) H. Sydow, *Dothistroma pini* et *Dothistroma septosporum* sont des champignons phytopathogènes causant des maladies des aiguilles sur les conifères. *Lecanosticta acicola* (anciennement nommé *Mycosphaerella dearnessii*) est l'agent des taches brunes des aiguilles et est classé comme parasite de quarantaine par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAI). *Dothistroma pini* et *Dothistroma septosporum* (anciennement regroupés sous le terme *Mycosphaerella pini*, Barnes *et al.* (2004)) sont les agents responsables de la maladie des bandes rouges des aiguilles et sont également classés comme parasites de quarantaine par l'UE (Directive CE/2000/29, annexe IIAII). Il est à noter que des cas de co-infection d'un même échantillon pour analyse par deux des trois parasites sont décrits dans la littérature.



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 ces agents pathogènes à dissémination aérienne doit être de type NS3.

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

La méthode repose sur l'emploi de la technique d'amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et de sondes marquées, respectivement spécifiques de *L. acicola*, de *D. septosporum* et de *D. pini* permet de détecter et d'amplifier une région discriminante de l'ADN génomique pour chacun de ces champignons. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de tissus d'aiguilles broyées.

L'utilisation en quadruplex real-time PCR d'une autre combinaison de sonde et d'amorce (18S uni-F/-R/-P) permet d'évaluer simultanément la qualité des extraits d'ADN testés.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *L. acicola*, *D. septosporum* et *D. pini* 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 l'une ou de plusieurs de ces 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 aiguilles de *Pinus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Larix decidua* et *Picea abies*. Néanmoins, selon l'évolution des connaissances scientifiques concernant ce parasite, cette méthode reste utilisable sur d'autres plantes si la gamme d'hôtes potentiels ou avérés venait à s'élargir. Les paramètres de validation de l'analyse seraient toutefois à adapter (p.ex. Ct seuil 18S).

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des aiguilles de *Pinus nigra* présentant des symptômes. Elle est toutefois utilisable sur les aiguilles des autres essences hôtes citées plus haut.

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

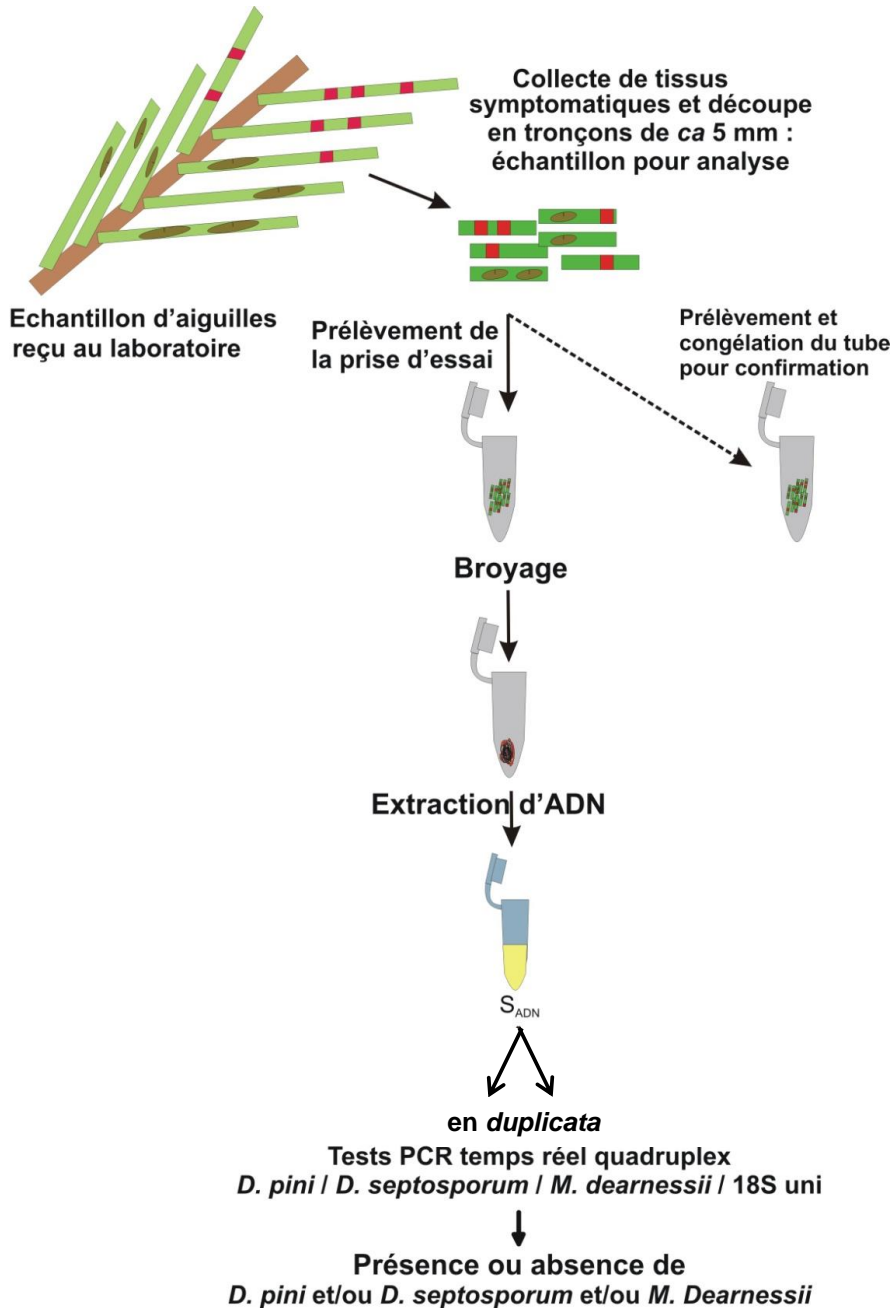
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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.



4. Principe de la méthode

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





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 de performance.

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 Eau

L'eau ultra pure (EUP) 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, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit initialement validé pour cette méthode est le PureLink Plant Total DNA purification kit (Invitrogen) (loos et al. 2010, dossier LNR de validation de la méthode MOA002).



5.3 Oligonucléotides

Cible	Test	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>L. acicola</i>	MDtef	MDtef-F1 ^a	CCTCCTTCATCTTCCCCTTC
		MDtef-R1 ^a	TGTGGGAGATAGCGTTGTCA
		MDtef-P1 ^a	Cy5-CAAGCACTCTTGGAACACACCGC-BHQ3/2
<i>D. pini</i>	DPtef	DPtef-F1 ^a	ACAGCAATCACACCCCTTGC
		DPtef-R1 ^a	TCATGTGCTCAATGTGAGATGT
		DPtef-P1 ^a	FAM-CCCCAGCCGATTACACGACG-BHQ1
<i>D. septosporum</i>	DStub	DStub2-F1 ^a	CGAACATGGACTGAGCAAAA
		DStub2-R1 ^a	TGCCTTCGTATCTGCATTTTC
		DStub2-P1 ^a	ROX-TGGAATCCACAGACGCGTCA-BHQ2
Plante/champignon	18S uni	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
		18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA
		18S uni-P ^b	JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1

^a (loos *et al.*, 2010)

^b (loos *et al.*, 2009)

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

5.4 Kit de PCR en temps-réel

Le kit initialement validé pour cette méthode est le qPCR core kit No ROX (Eurogentec) (loos *et al.* 2010, dossier LNR de validation de la méthode MOA002). Le kit QuantiTect Multiplex PCR NoROX kit (Qiagen) a été également validé (dossier LNR de validation de la méthode MOA002).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.
- Billes de broyage stériles en acier ou en carbure de tungstène de 3 mm de diamètre.

5.6 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel impose l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne



qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- 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'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 (loos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour un des parasites cibles ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection simultané des trois parasites (quadruplex). 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 S_{ADN} sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (aiguilles de *Pinus* sp.) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 18.8 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA002).*
- Un témoin négatif de processus (T_{PROC}) ou 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 de 2 ml stérile vide, subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN. Il est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon d'aiguilles de *Pinus* reconnu non contaminé par aucun des trois parasites cibles (témoin négatif de processus, T_{PROC}). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.
- Un témoin positif du test 18S uni (T_{+18S Pinus}) 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_{+18S Pinus} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P à partir d'ADN d'aiguilles de *Pinus*, ou d'une solution d'ADN d'aiguilles de *Pinus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillon à analyser.
- Un témoin positif en limite pratique de détection (T_{+LOD}) correspondant à chacun des parasites cibles sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel quadruplex. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamique, volumétrique, et chimique) pour que la plus petite quantité détectable de chacun des 3 parasites cibles puisse avoir été détectée dans un



échantillon par ce protocole. Ces T_{+LOD} sont chacun constitués d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de l'organisme cible ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR spécifique. Ces T_{+LOD} 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.

- 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 quadruplex. 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.

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 de performance.

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

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

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
	volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$
	congélateur : $\leq -18^\circ\text{C}$
	bain thermostaté : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$
	thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = 10%

*Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.



En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM », « JOE », « Cy5 » et « ROX » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été initialement développée et validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research.
- Broyeur de tissu oscillant (de type « beadbeater ») avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 ml.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai

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 d'au moins un rameau feuillé présentant des symptômes (cf. Annexe 1). 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 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. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis dans les cas où l'échantillon doit être pris en charge dans des conditions confinées.
- 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

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 30 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°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. 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 prise d'essai s'effectuera sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *L. acicola* (jaunissement d'aiguille + taches brunes), *D. pini* ou *D. septosporum* (jaunissement d'aiguilles + bandes rouges pour les deux espèces) ou éventuellement des symptômes douteux.

Les prélèvements s'effectuent sur des aiguilles où des tronçons d'environ 5 mm ciblant les régions les plus pertinentes seront découpés à l'aide d'un scalpel stérile. Transférer au maximum 15 tronçons d'aiguilles dans un microtube stérile de 2 ml (moins si on ne dispose pas de suffisamment de portions d'aiguilles avec des symptômes typiques). Ceci constituera la prise d'essai.

En cas d'absence de symptômes typiques bien visibles, prélever alors des tronçons d'aiguilles dans des parties jaunissantes, en conservant lorsque c'est possible une marge de tissu vert.

A cette étape, et lorsque la quantité d'aiguilles symptomatiques le permet, il est recommandé de préparer un tube supplémentaire de fragments, de l'identifier et de le conserver congelé en cas de nécessité de confirmation des cas positifs par un laboratoire de référence.

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. Prélever deux billes de broyage, ouvrir le microtube contenant la prise d'essai et y transférer deux billes de broyage stériles.
4. 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.
5. Placer le microtube sur le portoir du broyeur et broyer environ 2 minutes à une fréquence d'agitation d'environ 30 Hz, soit 1800 coups par minute. Pendant la phase de broyage, arrêter



- à au moins une reprise l'agitation et retourner en l'agitant ou vortexant plusieurs fois le microtube.
6. Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour recueillir l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse.
 7. Incuber chaque tube pendant la durée et 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.
 8. À la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
 9. 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.
 10. À la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total 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 (SADN).

8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection *D. pini*, *D. septosporum* et *L. acicola* (Test quadruplex MDtef, DPtef, DStub et 18S uni)

Le volume réactionnel est 20 µl : 18 µl du mélange réactionnel et 2 µl de S_{ADN} à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µl
QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen)	1X
Amorce MDtef-F1	0.3 µM
Amorce MDtef-R1	0.3 µM
Sonde MDtef-P1	0.1 µM
Amorce DPtef-F1	0.3 µM
Amorce DPtef-R1	0.3 µM
Sonde DPtef-P1	0.1 µM
Amorce DStub-F1	0.3 µM
Amorce DStub-R1	0.3 µM
Sonde DStub-P1	0.1 µM
Amorce 18S uni-F	0.3 µM
Amorce 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.
3. Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
4. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant pendant 5 à 10 secondes environ, avant sa distribution.
5. Le mélange réactionnel est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µl par microtube.

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

1. Les différentes solutions S_{ADN} correspondant aux différentes prises d'essai sont testées en *duplicata* (2 tubes ou capillaires PCR individuels) à raison de 2 µl par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutés et testées en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T-, 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 quadruplex

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *D. pini*, *D. septosporum* et *L. acicola* sont les suivants :



Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN*	95 °C	10 min	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	60°C	55 sec puis mesure de la fluorescence FAM, JOE, ROX et Cy5	

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

À 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 :

- Aucun des réplicats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM », « Rox » et « Cy5 » 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 », « Rox » et « Cy5 » 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 de T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM », « Rox » et « Cy5 » 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 *D. pini*, *D. septosporum* et *L. acicola*.



Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.

9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S_{ADN} , donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

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

L'analyse des résultats pour une prise d'essai, ainsi que les règles de décision applicables sont présentées en annexe 2 (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 MOA002.

Pour l'évaluation des critères de performance, le qPCR core kit no ROX (Eurogentec) ainsi que le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen) ont été utilisés. Les différentes valeurs obtenues sont présentées pour chaque kit utilisé.

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none">• L'efficacité de la réaction quadruplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de <i>Pinus nigra</i> a été évaluée à 0,99 pour <i>D. pini</i>, à 1.02 pour <i>D. septosporum</i> et 1.03 pour <i>L. acicola</i> en utilisant le qPCR core kit no ROX (Eurogentec).• L'efficacité de la réaction quadruplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de <i>Pinus nigra</i> a été évaluée à 1.01 pour <i>D. pini</i>, à 0.92 pour <i>D. septosporum</i> et 0.96 <i>L. acicola</i> en utilisant le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).• Le R^2 calculé pour les deux kits PCR et pour les trois cibles est de 0,99.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 484, 48 et 48 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR respectivement pour <i>D. pini</i> , <i>D. septosporum</i>



	<p>et <i>L. acicola</i> (soit 24.2, 2.4 et 2.4 cp/μL) pour une réaction quadruplex avec dilution dans du TE (1x) en utilisant le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).</p>																																					
Spécificité analytique	<p>La spécificité analytique a été évaluée sur une gamme appropriée de différentes espèces génétiquement proches des cibles (11 isolats représentant 2 espèces pour <i>D. pini</i>, 12 isolats représentant 2 espèces pour <i>D. septosporum</i>, 11 isolats représentant 2 espèces pour <i>L. acicola</i>) et d'espèces de champignons qui partagent le même genre de plante hôte (19 espèces, 19 isolats) et en utilisant qPCR core kit no ROX (Eurogentec) et le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique pour les deux kits de PCR en temps réel utilisés.</p>																																					
Inclusivité	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée in silico par blast sur la base de données GenBank et in vitro sur une gamme d'isolats de <i>D. pini</i> (6 isolats), de <i>D. septosporum</i> (5 isolats) et de <i>L. acicola</i> (6 isolats) de différentes provenances géographiques, en utilisant qPCR core kit no ROX (Eurogentec) et le QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kit (Qiagen).</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif pour les deux kits de PCR en temps réel utilisés.</p>																																					
Répétabilité et reproductibilité	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'ADN génomique extraits à partir de cultures fongiques calibrées dosés à 4 concentrations proches de la limite de détection et dilués dans de l'ADN de <i>Pinus nigra</i>, et sur un échantillon de pin naturellement contaminé par l'une des trois cibles, en utilisant le qPCR core kit no ROX (Eurogentec)</p> <p>Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :</p> <p>Cible <i>D.pini</i> :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cible</th> <th rowspan="2">concentration en pg</th> <th colspan="2">Coefficient de Variation des Ct (%)</th> <th colspan="2">résultat qualitatif</th> </tr> <tr> <th>répétabilité</th> <th>reproductibilité</th> <th>répétabilité</th> <th>reproductibilité</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">ADN génomique</td> <td>2000</td> <td>0.2</td> <td>0.1</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>200</td> <td>0.6</td> <td>1.1</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>0.9</td> <td>1.0</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>2 (LOD)</td> <td>1.2</td> <td>1.1</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Echantillon</td> <td>nd</td> <td>0.5</td> <td>0.6</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité	ADN génomique	2000	0.2	0.1	+	+	200	0.6	1.1	+	+	20	0.9	1.0	+	+	2 (LOD)	1.2	1.1	+	+	Echantillon	nd	0.5	0.6	+	+
Cible	concentration en pg			Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif																																
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité																																	
ADN génomique	2000	0.2	0.1	+	+																																	
	200	0.6	1.1	+	+																																	
	20	0.9	1.0	+	+																																	
	2 (LOD)	1.2	1.1	+	+																																	
Echantillon	nd	0.5	0.6	+	+																																	

**Cible *D. septosporum* :**

Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif	
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
ADN génomique	2000	0.7	0.3	+	+
	200	0.6	0.5	+	+
	20	1.0	1.4	+	+
	2 (LOD)	1.1	1.5	+	+
Echantillon	nd	1.0	1.3	+	+

Cible *L. acicola* :

Cible	concentration en pg	Coefficient de Variation des Ct (%)		résultat qualitatif	
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
ADN génomique	2000	0.4	0.6	+	+
	200	0.7	1.0	+	+
	20	1.1	1.5	+	+
	2 (LOD)	1.3	1.7	+	+
Echantillon	nd	0.9	1.4	+	+

Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%.

Le test quadruplex est donc répétable et reproductible.



Annexe 1 : Symptômes de la maladie des bandes rouges et des taches brunes



Figure 1

Fig. 1 : Maladie des bandes rouges. Au printemps, les taches se développent en encerclant l'aiguille pour former des bandes brun-rougeâtre caractéristiques. Ces dernières sont essentiellement localisées au niveau de l'apex et de la partie médiane de l'aiguille. (Photo ANSES-LSV)



Figure 2

Fig. 2 : Maladie des bandes rouges. Un autre symptôme caractéristique correspond au dessèchement de la zone apicale des aiguilles tandis que la base reste verte. Les bandes rougeâtres ne sont pas toujours bien visibles et les aiguilles peuvent présenter un brunissement général. Ces symptômes peuvent être confondus avec ceux causés par *Lecanosticta acicola* ou d'autres agents pathogènes des aiguilles de pins. (Photo ANSES-LSV)



Figure 3

Fig. 3 : Maladie des taches brunes. Apparition sur aiguilles âgées de nombreuses petites taches jaunâtres devenant brunes et souvent délimitées par une bordure plus foncée. Un halo jaune est également souvent visible autour de la tache. (Photo ANSES-LSV)



Figure 4

Fig. 4 : Maladie des taches brunes. Les aiguilles affectées présentent souvent trois zones distinctes caractéristiques : une base restant verte, une partie médiane ponctuée de taches pouvant devenir coalescentes et une extrémité desséchée. A terme, les aiguilles sèchent et tombent à l'automne. Seules les aiguilles de l'année restent saines. (Photo ANSES-LSV)



Annexe 2 : Tables décisionnelles

Type Résultat	Test DStub	Test DPtef	Test MDtef	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	+/+	FIN	D. septosporum détecté dans E D. pini détecté dans E L. acicola détecté dans E
2	+/+	+/+	-/-	FIN	D. septosporum détecté dans E D. pini détecté dans E
3	+/+	-/-	+/+	FIN	D. septosporum détecté dans E L. acicola détecté dans E
4	+/+	-/-	-/-	FIN	D. septosporum détecté dans E
5	-/-	+/+	+/+	FIN	D. pini détecté dans E L. acicola détecté dans E
6	-/-	+/+	-/-	FIN	D. pini détecté dans E
7	-/-	-/-	+/+	FIN	L. acicola détecté dans E
8	-/-	-/-	-/-	Procéder à l'interprétation du test 18S uni	Cf table test 18S uni
9	+/-	Quel que soit le résultat	Quel que soit le résultat	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour DStub : D. septosporum détecté dans E. • Si résultat -/- obtenu pour DStub et si aucune autre cible n'est détectée, procéder à l'interprétation du test 18S uni.
10	Quel que soit le résultat	+/-	Quel que soit le résultat	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour DPtef : D. pini détecté dans E. • Si résultat -/- pour DPtef, procéder à l'interprétation du test 18S uni si aucune autre cible n'est détectée.
11	Quel que soit le résultat	Quel que soit le résultat	+/-	Refaire test quadruplex	Suite au nouveau test quadruplex : • Si résultat +/+ ou +/- obtenu pour MDtef : L. acicola détecté dans E. • Si résultat -/- obtenu pour MDtef, procéder à l'interprétation du test 18S uni si aucune autre cible n'est détectée.



Type Résultat	Test 18S uni	Action	Interprétation / démarche à suivre
A	+/+	FIN	<i>D. septosporum</i> non détecté dans E <i>D. pini</i> détecté non détecté dans E <i>L. acicola</i> non détecté dans E
B	+/-	Refaire test quadruplex sur S _{ADN} dilué au 1/10e	Suite au nouveau test quadruplex, les résultats sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux sur les solutions pures. Si +/- ou -/- est obtenu à nouveau pour 18S uni, FIN : Résultat indéterminé pour E . Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)
C	-/-	Refaire test quadruplex sur S _{ADN} dilué au 1/10e	Suite au nouveau test quadruplex, les résultats sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux sur les solutions pures. Si +/- ou -/- est obtenu à nouveau pour 18S uni, FIN : Résultat indéterminé pour E . Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)

* Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai.



Bibliographie

- Barnes I, Crous PW, Wingfield BD & Wingfield MJ (2004) Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology* **50**, 551-565.
- Ioos R, Fourrier C, Iancu G & Gordon TR (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.
- Ioos R, Fabre B, Saurat C, Fourrier C, Frey P & Marçais B (2010) Development, Comparison, and Validation of Real-Time and Conventional PCR Tools for the Detection of the Fungal Pathogens Causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of Pine. *Phytopathology* **100**, 105-114.