

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA045- Version 1

Novembre 2016

Détection de *Monilinia fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* par la technique de PCR en temps réel multiplexe



Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons phytopathogènes sur toute matrice »



Historique de la méthode

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

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1		Novembre 2016	Version initiale



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 méthode a été mise au point, optimisée et validée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (Guinet et al., 2016).

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	9
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.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	13
8 Mode opératoire.....	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ADN total	14
8.3 Test de détection par PCR en temps réel quadruplex	15
9 Résultats.....	16
9.1 Contrôle de la validité des résultats	16
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe 1 : schéma décisionnel	21
Bibliographie.....	22



Introduction

Monilinia fructicola (Winter) Honey, *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland) et *Monilinia fructigena* (Honey) sont des champignons ascomycètes. Leur gamme d'hôtes couvre les arbres fruitiers de la famille des Rosaceae, notamment les *Prunus* spp, les *Pyrus* spp. et les *Malus* spp.. Ils sont les agents principaux de chancre sur rameaux, de dépérissements de fleurs et de pourritures sur fruits. La maladie due à ces champignons (Brown Rot) provoque de nombreux dégâts sur les fruits, avant et après récolte.

Cette méthode qualitative permet de détecter la présence de *Monilinia fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* dans des tissus végétatifs par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.



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.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

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

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

Les tubes et autres consommables plastiques ayant été utilisés lors de la phase de préparation du mix et chargement des solutions d'ADN (S_{ADN}) peuvent être éliminés sans traitement particulier.



1 Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Monilinia fructicola* (*Mfcl*), *Monilinia laxa* (*Mlx*) et *Monilinia fructigena* (*Mfgn*) sur tissu végétal présentant des symptômes de *Malus*, *Pyrus* et *Prunus* et à partir de culture pure. La présence de ces trois espèces 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 *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* 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 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 végétaux de *Pyrus*, *Prunus* et *Malus*.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des tissus végétatifs, des fruits, des fleurs de *Malus* et *Prunus* présentant des symptômes, ainsi que sur des cultures pures de *Monilinia* spp..

Grandeur de l'objet soumis à analyse : La méthode s'applique sur tissus végétatifs de toute taille (tissus nécrotiques, tissus sous corticaux de branches ou tronc, pétioles, bourgeons, fleurs etc.) de *Malus*, *Pyrus* et *Prunus* spp. ainsi que sur des cultures pures fongiques.

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

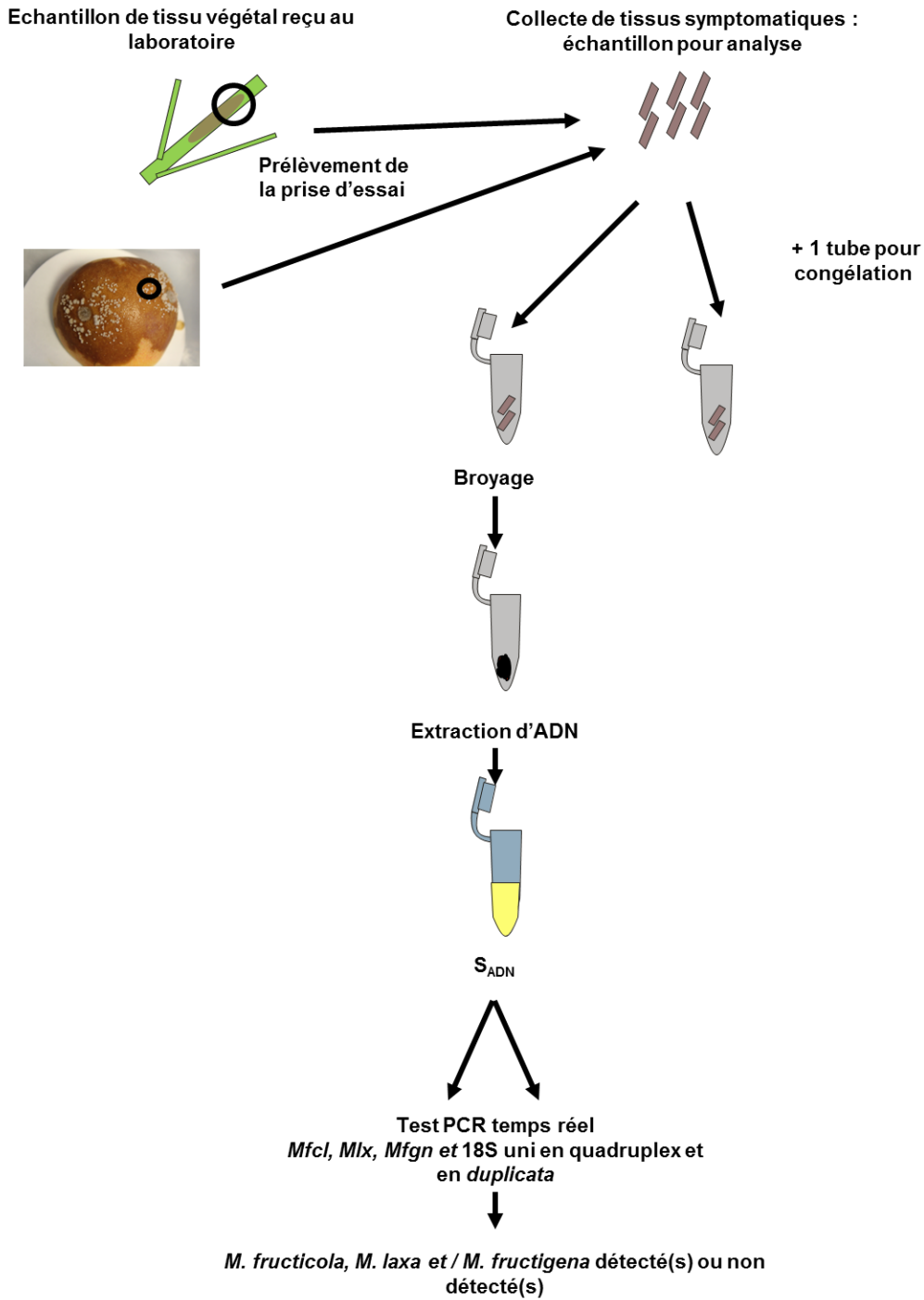
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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-dessous :





5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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 et ADN de microorganismes présents 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 (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004, Guinet *et al.* (2016)).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>Monilinia fructicola</i>	Mfcl368-F ^a	ACTAAACGACGCGGTAATGG
	Mfcl368-R ^a	CTTTAACTTCTTAGCCGCTCCA
	Mfcl368-P ^a	[FAM]-CACGAATGTCGTGAAAGGATAATGGA-[BHQ1]
<i>Monilinia laxa</i>	Mlx368-F ^a	CCAAGGGCTCCGTAGGTAA
	Mlx368-R ^a	TCCACACCGTCGAACAATAA
	Mlx368-P ^a	[ROX]-CAGATCGTGAAGGGCGTGAGGT-[BHQ2]
<i>Monilinia fructigena</i>	Mfgn368-F ^a	AGCACAGCGAGTACAATAAGC
	Mfgn368-R ^a	TACCCAGACACCACCTCCTC
	Mfgn368-P ^a	[Cy5]-TGCTCCGTAGGCAATCGGTAAAGA-[BHQ2]
Plante/champignon	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

^a Guinet *et al.* (2016)

^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 d'amplification initialement validé pour cette méthode est le Mastermix No ROX (Eurogentec) (cf dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004, Guinet *et al.* (2016)).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre 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.
- Tubes de lysing matrix A (MP Biomedicals) ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente pour le broyage des tissus lignifiés et des fleurs (cf dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004).
- Tubes de lysing matrix C (MP Biomedicals) ou tube 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 pures (cf dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004).

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),
- qu'il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

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

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (Ioos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour au moins



un des tests *M. fructicola*, *M. laxa* ou *M. fructigena* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* (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 le type de matrice testé (tissus végétatifs de *Malus* ou *Pyrus*) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de validation de ce test et pour des échantillons de fruits de Malus, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S Uni a été déterminée à 14,9 (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004). Les valeurs de Ct seuil 18S Uni pour les autres organes de Malus ainsi que pour les Pyrus et les Prunus n'ont pas été déterminées.*

- Un témoin négatif d'extraction ($T_{-extr.}$) sera préparé pour toute série d'extractions. Une prise d'échantillon "vide", c'est-à-dire un microtube de 2 mL stérile vide, 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 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_{+18S}) 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} est constitué d'une solution d'ADN génomique de *Malus* ou *Pyrus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.
- Un témoin positif en limite pratique de détection (T_{+LOD}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel. 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 *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'un mélange de trois solutions calibrées de plasmides bactériens dans lesquels sont insérées la cible des tests PCR Mfcl368-F/-R/-P, Mlx368-F/-R/-P et Mfgn368-F/-R/-P. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. *Dans les conditions de validation du LNR, la limite de détection du test a été estimée à 438, 474 et 480 copies plasmidiques de cible respectivement M. fructicola, M. laxa et M. fructigena par tube de PCR (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004).*
- 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 (2^{ème} type de faux positifs).

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



6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 022 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 », « ROX », « Cy5 » et « JOE » ou des fluorophores de spectres équivalents. Cette méthode a été validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research (cf Dossier LNR de validation de la méthode MIAM 004).
- Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur de tissu orbital oscillant (de type Fast Prep, MP Biochemicals) avec adaptateur et portoirs pour tubes de 2 mL. Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : Les échantillons sont constitués d'au moins un fruit, une fleur ou un rameau présentant des symptômes, ou 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 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.

Fiche de demande d'analyse : 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. 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 se réalise de préférence sous hotte permettant la réalisation des manipulations en conditions stériles. Chaque échantillon est traité individuellement.

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.

Sur fruit, la prise d'essai s'effectue sur symptômes typiques d'une infection par *Monilinia* (tissus nécrotiques avec ou sans coussinet sporifère). De fines lamelles de la surface du fruit (maximum de 2 mm d'épaisseur) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube de lysing matrix A ou équivalent, en veillant à ne pas dépasser un volume représentant environ le quart du volume du tube. Prélever uniquement dans les zones nécrosées et préférentiellement dans celles présentant des coussinets sporifères (biomasse de *Monilinia* plus importante à ces endroits). 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 un laboratoire de référence.

A partir de rameaux présentant des chancre typiques d'une attaque de *Monilinia*, de fines lamelles de la zone chancreuse (maximum de 2 mm³ pour chacune d'entre elles) seront prélevées à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placées dans un microtube de lysing matrix A ou équivalent qui sera refermé immédiatement. La prise d'essai se fera uniquement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée, avec un volume maximal ne dépassant pas le quart du volume du tube.



A partir d'une inflorescence présentant des symptômes d'attaque de *Monilinia*, une fleur entière est prélevée à l'aide d'une lame de scalpel stérile et placée dans un microtube de lysing matrix A ou équivalent qui sera refermé immédiatement. Plusieurs fleurs peuvent être prélevées mais chacune sera placée individuellement dans un microtube.

A partir d'une culture pure, le prélèvement doit s'effectuer sur une culture de moins de 15 jours. 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 à prélever 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

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 ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
7. A la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
8. 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.
9. A 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 (S_{ADN}).



8.3 Test de détection par PCR en temps réel quadruplex

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection

Le volume réactionnel est 20 μl : 18 μl de 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
Mastermix No ROX (Eurogentec)*	1x
Amorce sens Mfcl368-F	0.2 μM
Amorce antisens Mfcl368-R	0.2 μM
Sonde Mfcl368-P	0.05 μM
Amorce sens Mlx368-F	0.2 μM
Amorce antisens Mlx368-R	0.2 μM
Sonde Mlx368-P	0.05 μM
Amorce sens Mfgn368-F	0.2 μM
Amorce antisens Mfgn368-R	0.2 μM
Sonde Mfgn368-P	0.05 μM
Amorce sens 18S Uni-F	0.2 μM
Amorce antisens 18S Uni-R	0.2 μM
Sonde 18S Uni-P	0.05 μM

* le pré-mix contient de l'Uracil-N-glycosylase (UNG pour prévenir les autocontaminations provenant des réactions d'amplification précédentes.

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

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* : $T_{\text{-extr}}$, $T_{\text{+LOD}}$, etc. Pour le $T_{\text{-}}$, 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 *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* sont les suivants (Guinet *et al.*, 2016):

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Activation de l'UNG	50°C *	2 min *	1
2	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C *	10 min *	1
3	Dénaturation	95°C	15 sec	40
4	Hybridation - polymérisation	60°C	60 sec puis mesure des différentes fluorescences	

* 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 », ou « 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 », ou « 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 *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena*.

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.

- Si les deux réplicats de la prise d'essai sont positifs pour un test spécifique (*M. fructicola*, *M. laxa* ou *M. fructigena*), la prise d'essai considérée est dite positive pour l'organisme considéré. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « ***M. fructicola*, *M. laxa* et/ou *M. fructigena* détecté(s) dans l'échantillon analysé** ».
- Si un seul réplicat parmi les deux de la prise d'essai est positif pour l'un des tests spécifiques (*M. fructicola*, *M. laxa* ou *M. fructigena*), refaire le test considéré en *duplicata* (le résultat de ce nouveau test sera analysé comme un nouvel extrait). Si le même résultat est obtenu, le résultat sera considéré comme non interprétable.
- Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour l'ensemble des tests spécifiques (*M. fructicola*, *M. laxa* ou *M. fructigena*) et que la S_{ADN} de la prise d'essai est positive pour le test 18S uni (voir §5.6), l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « ***M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* non détectés dans l'échantillon analysé** ».
- Si aucun des réplicats de la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour les trois tests spécifiques (*M. fructicola*, *M. laxa* ou *M. fructigena*) et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test 18S uni (voir §5.6), la prise d'essai est dite « non utilisable » pour la recherche de *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena*. Ce cas de figure traduit i) une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN}, ou ii) une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée. Une dilution au dixième, puis si échec au centième, de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Les résultats obtenus sur les solutions diluées seront interprétés comme ceux sur les solutions pures. Si le même résultat est à nouveau obtenu, il faudra vérifier qu'une quantité suffisante d'ADN a été extraite pour chacune des prises d'essai par dosage au spectrophotomètre ou par électrophorèse sur gel par comparaison avec ce qui est obtenu avec des échantillons de même type. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée et une nouvelle prise d'essai sera réalisée si la taille de l'échantillon le permet. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé et si une nouvelle prise d'essai n'est pas



possible, le résultat sera alors exprimé par « **résultat indéterminé** », et il conviendra de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

Le diagramme décisionnel présenté en annexe 1 résume ces conditions.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<p>L'efficacité de la réaction quadruplex sur une gamme de solutions plasmidiques calibrées diluées dans du TE (1X), a été évaluée à</p> <ul style="list-style-type: none">-Mfcl : 83,7% ($R^2=0.9999$)-Mfgn : 89,2% ($R^2=0.9993$)-Mlx : 86,3% ($R^2=0.9996$) <p>Lorsque la gamme est préparée dans de l'ADN d'un pool végétal à 1ng/μL, l'efficacité a été évaluée à</p> <ul style="list-style-type: none">-Mfcl : 73,2% ($R^2=0.9802$)-Mfgn : 84,6% ($R^2=0.9947$)-Mlx : 71,8% ($R^2=0.9801$) <p>Pour <i>Mfcl</i> et notamment <i>Mlx</i>, l'efficacité est affectée pour les plus faibles dilutions, cependant les cibles restent détectables jusqu'à 0,5 pg.</p>
Sensibilité analytique	<p>La sensibilité analytique a été estimée à 438, 480 et 474 copies plasmidiques d'ADN de la cible (respectivement <i>Mfcl</i>, <i>Mfgn</i> et <i>Mlx</i>) par tube de PCR (soit respectivement 21.9 ; 24 et 23.7 cp/μL) pour une réaction quadruplex avec dilution dans du TE (1X).</p>
Spécificité analytique	<p>La spécificité analytique du test a été évaluée <i>in vitro</i> sur 42 isolats de <i>Monilinia</i> spp., dont 5 isolats de <i>Monilinia polystroma</i>, et sur 13 isolats de champignons proches de <i>Monilinia</i> ou retrouvés fréquemment sur les fruitiers.</p> <p>Le test est 100% spécifique.</p>
Inclusivité	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée <i>in silico</i> par BLAST sur la base de données Genbank et <i>in vitro</i> sur une gamme représentative d'isolats de <i>Mfcl</i>, <i>Mfgn</i> et <i>Mlx</i> de différentes provenances géographiques.</p>



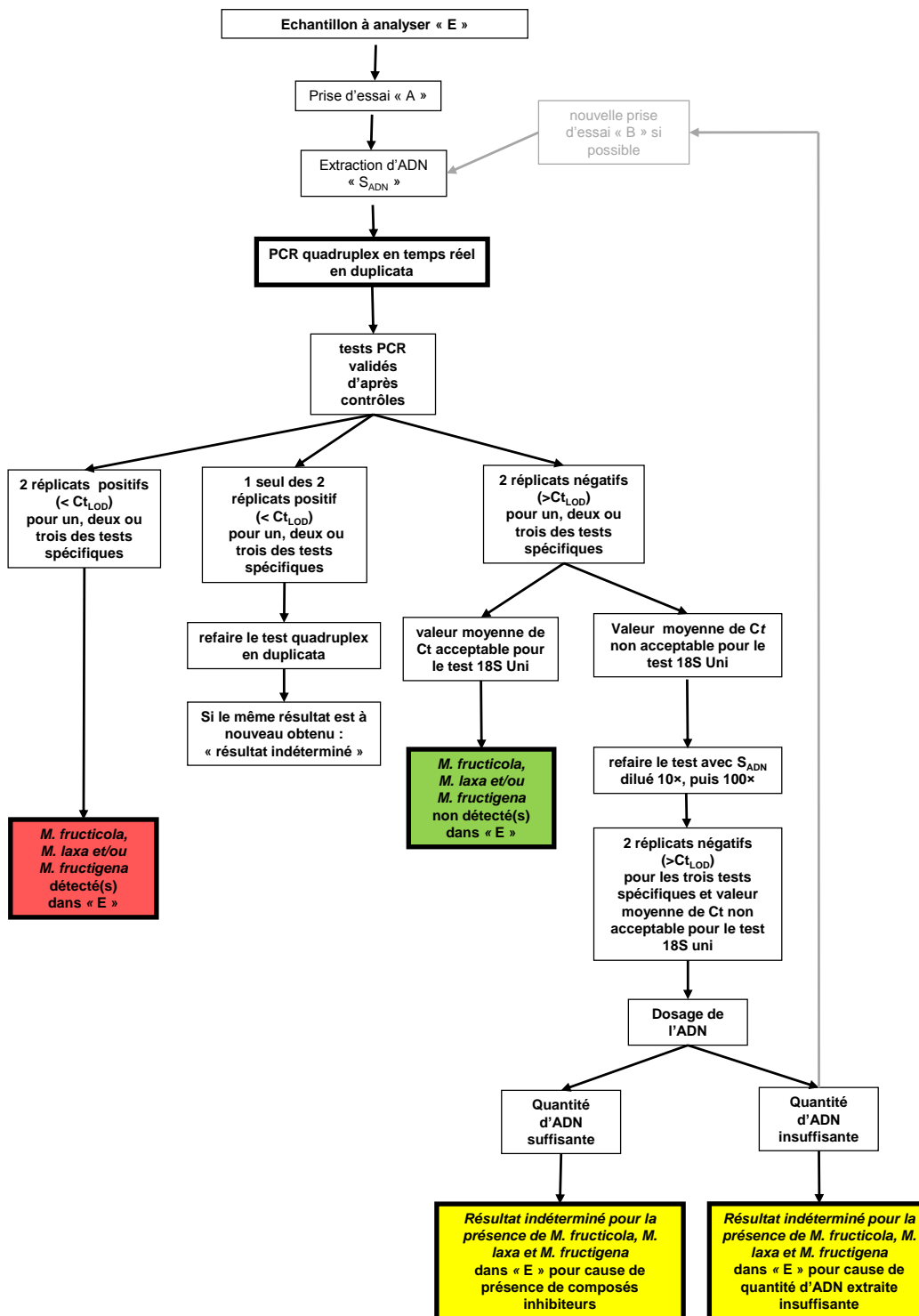
<p>Répétabilité et reproductibilité</p>	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée diluée dans de l'ADN génomique de plante, dosée à 3 concentrations dont une proche de la LOD et, pour la répétabilité uniquement, sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de mirabelle naturellement contaminée. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous :</p> <p>Répétabilité :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">Mfcl</th> <th colspan="3">Mlx</th> <th colspan="3">Mfgn</th> </tr> <tr> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>résultat qualitatif</th> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>résultat qualitatif</th> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>résultat qualitatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000 Tlod</td> <td>20,80 ± 0,31</td> <td>1,50</td> <td>+</td> <td>20,70 ± 0,78</td> <td>3,78</td> <td>+</td> <td>19,85 ± 0,26</td> <td>1,32</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>100 Tlod</td> <td>24,13 ± 0,12</td> <td>0,49</td> <td>+</td> <td>25,85 ± 0,71</td> <td>5,08</td> <td>+</td> <td>23,19 ± 0,18</td> <td>0,78</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>10 Tlod</td> <td>28,55 ± 0,31</td> <td>1,08</td> <td>+</td> <td>> 40</td> <td>nd</td> <td>-</td> <td>27,72 ± 0,24</td> <td>0,85</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Mom1</td> <td>> 40</td> <td>nd</td> <td>-</td> <td>19,93 ± 0,81</td> <td>4,05</td> <td>+</td> <td>> 40</td> <td>nd</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>Reproductibilité :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="3">Mfcl</th> <th colspan="3">Mlx</th> <th colspan="3">Mfgn</th> </tr> <tr> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>Résultat qualitatif</th> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>Résultat qualitatif</th> <th>Ct moyen ± SD</th> <th>CV</th> <th>Résultat qualitatif</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1000 Tlod</td> <td>20,62 ± 0,19</td> <td>0,91</td> <td>+</td> <td>22,35 ± 1,41</td> <td>6,32</td> <td>+</td> <td>20,17 ± 0,34</td> <td>1,68</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>100 Tlod</td> <td>24,22 ± 0,27</td> <td>1,12</td> <td>+</td> <td>27,76 ± 1,62</td> <td>5,82</td> <td>+</td> <td>23,73 ± 0,37</td> <td>1,56</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>10 Tlod</td> <td>28,80 ± 0,56</td> <td>1,94</td> <td>+</td> <td>> 40</td> <td>nd</td> <td>-</td> <td>27,94 ± 0,39</td> <td>1,40</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> <p>La répétabilité et la reproductibilité qualitatives sont toutes les deux à 100% et les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10 %.</p> <p>Le test est donc répétable et reproductible.</p>		Mfcl			Mlx			Mfgn			Ct moyen ± SD	CV	résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	résultat qualitatif	1000 Tlod	20,80 ± 0,31	1,50	+	20,70 ± 0,78	3,78	+	19,85 ± 0,26	1,32	+	100 Tlod	24,13 ± 0,12	0,49	+	25,85 ± 0,71	5,08	+	23,19 ± 0,18	0,78	+	10 Tlod	28,55 ± 0,31	1,08	+	> 40	nd	-	27,72 ± 0,24	0,85	+	Mom1	> 40	nd	-	19,93 ± 0,81	4,05	+	> 40	nd	-		Mfcl			Mlx			Mfgn			Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif	1000 Tlod	20,62 ± 0,19	0,91	+	22,35 ± 1,41	6,32	+	20,17 ± 0,34	1,68	+	100 Tlod	24,22 ± 0,27	1,12	+	27,76 ± 1,62	5,82	+	23,73 ± 0,37	1,56	+	10 Tlod	28,80 ± 0,56	1,94	+	> 40	nd	-	27,94 ± 0,39	1,40	+
			Mfcl			Mlx			Mfgn																																																																																																				
Ct moyen ± SD		CV	résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	résultat qualitatif																																																																																																				
1000 Tlod	20,80 ± 0,31	1,50	+	20,70 ± 0,78	3,78	+	19,85 ± 0,26	1,32	+																																																																																																				
100 Tlod	24,13 ± 0,12	0,49	+	25,85 ± 0,71	5,08	+	23,19 ± 0,18	0,78	+																																																																																																				
10 Tlod	28,55 ± 0,31	1,08	+	> 40	nd	-	27,72 ± 0,24	0,85	+																																																																																																				
Mom1	> 40	nd	-	19,93 ± 0,81	4,05	+	> 40	nd	-																																																																																																				
	Mfcl			Mlx			Mfgn																																																																																																						
	Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif	Ct moyen ± SD	CV	Résultat qualitatif																																																																																																				
1000 Tlod	20,62 ± 0,19	0,91	+	22,35 ± 1,41	6,32	+	20,17 ± 0,34	1,68	+																																																																																																				
100 Tlod	24,22 ± 0,27	1,12	+	27,76 ± 1,62	5,82	+	23,73 ± 0,37	1,56	+																																																																																																				
10 Tlod	28,80 ± 0,56	1,94	+	> 40	nd	-	27,94 ± 0,39	1,40	+																																																																																																				
<p>Robustesse</p>	<p>La robustesse a été évaluée d'une part en faisant varier le volume d'ADN matrice et le volume réactionnel de ±10% et d'autre part en faisant varier la température d'hybridation/synthèse de ±2°C, en testant 12 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 2 concentrations (LOD et 100 LOD) et 3 réplicats d'ADN extraits de cultures fongiques proches de <i>Monilinia</i> spp. Les tableaux ci-dessous présentent les résultats de robustesse obtenus pour les échantillons contenant les espèces cibles :</p>																																																																																																												



		Cible Mfcl																			
			valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif											
100Tlod	volume réactionnel	18 µL	24.07 ± 0.14 a	+	20 µL	24.27 ± 0.11 b	+	22 µL	24.43 ± 0.10 c	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	24.85 ± 0.13 a,b	+	2 µL	24.91 ± 0.14 b	+	2.2 µL	24.71 ± 0.10 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	25.53 ± 0.17 c	+	60°C	24.27 ± 0.11 a	+	62°C	25.36 ± 0.13 b	+											
Tlod	volume réactionnel	18 µL	31.25 ± 0.43 a	+	20 µL	31.39 ± 0.47 a	+	22 µL	31.37 ± 0.51 a	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	32.11 ± 0.53 a	+	2 µL	31.89 ± 0.62 a	+	2.2 µL	31.78 ± 0.71 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	33.62 ± 1.21 c	+	60°C	31.39 ± 0.47 a	+	62°C	32.37 ± 0.73 b	+											
		Cible Mix																			
			valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif											
100Tlod	volume réactionnel	18 µL	25.00 ± 0.18 a	+	20 µL	25.20 ± 0.24 a	+	22 µL	25.55 ± 0.26 b	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	25.28 ± 0.29 a	+	2 µL	25.27 ± 0.21 a	+	2.2 µL	25.01 ± 0.24 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	25.96 ± 0.21 b	+	60°C	25.20 ± 0.24 a	+	62°C	26.16 ± 0.14 b	+											
Tlod	volume réactionnel	18 µL	32.45 ± 0.43 a	+	20 µL	33.24 ± 0.53 b	+	22 µL	33.13 ± 0.53 b	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	32.88 ± 0.51 a	+	2 µL	32.49 ± 0.30 a	+	2.2 µL	32.53 ± 0.61 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	33.62 ± 0.74 a	+	60°C	33.24 ± 0.53 a	+	62°C	33.53 ± 0.49 a	+											
		Cible Mfgn																			
			valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif		valeur de Ct moyen (± SD) ^d	résultat qualitatif											
100Tlod	volume réactionnel	18 µL	23.32 ± 0.13 a	+	20 µL	23.45 ± 0.16 a	+	22 µL	23.64 ± 0.19 b	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	23.93 ± 0.23 b	+	2 µL	23.86 ± 0.21 a,b	+	2.2 µL	23.66 ± 0.15 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	24.43 ± 0.18 b	+	60°C	23.45 ± 0.16 a	+	62°C	24.64 ± 0.11 c	+											
Tlod	volume réactionnel	18 µL	30.13 ± 0.33 a	+	20 µL	30.82 ± 0.46 b	+	22 µL	30.90 ± 0.29 b	+											
	Volume d'ADN matrice	1.8 µL	31.08 ± 0.73 a	+	2 µL	30.77 ± 0.30 a	+	2.2 µL	30.69 ± 0.47 a	+											
	Température d'hybridation	58°C	31.53 ± 0,58 b	+	60°C	30.82 ± 0,46 a	+	62°C	31.43 ± 0,67 a,b	+											
^d les chiffres suivis par une même lettre ne sont pas statistiquement différents selon le test de Tukey																					
En faisant varier les volumes d'ADN matrice ou de mix réactionnel, ou en faisant varier la température d'hybridation, le test reste robuste, avec 100% de résultats positifs lorsque les cibles sont présentes. Pour les échantillons non-cibles, 100% de résultats négatifs sont obtenus quelques soit les variations de paramètres (données non montrées).																					
Sensibilité relative	La nouvelle méthode a été comparée à l'ancienne méthode MOA025 en testant des extraits d'ADN de fruits artificiellement contaminés par <i>M. fructicola</i> . Les résultats qualitatifs pour chaque cible ont été comparés par rapport au résultat attendu.																				
	Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous :																				
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>MOA 025</th> <th>MIAM 004</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Spécificité</td> <td>100 %</td> <td>100 %</td> </tr> <tr> <td>Sensibilité</td> <td>100 %</td> <td>100 %</td> </tr> <tr> <td>Exactitude</td> <td>100 %</td> <td>100 %</td> </tr> </tbody> </table>											MOA 025	MIAM 004	Spécificité	100 %	100 %	Sensibilité	100 %	100 %	Exactitude	100 %
	MOA 025	MIAM 004																			
Spécificité	100 %	100 %																			
Sensibilité	100 %	100 %																			
Exactitude	100 %	100 %																			
Spécificité relative																					
Exactitude relative	La MIAM 004 présente des valeurs maximales de sensibilité relative et de spécificité relative, à l'égal de celles produites par MOA025.																				



Annexe 1 : schéma décisionnel





Bibliographie

Guinet C, Fourrier-Jeandel C, Cerf-Wendling I & Ios R (2016) One-Step Detection of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa* on *Prunus* and *Malus* by a Multiplex Real-Time PCR Assay. *Plant Disease*, PDIS-05-16-0655-RE.

Ios 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.