

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA001- Version 2

Février 2017

Détection d' *Hymenoscyphus fraxineus* par PCR en temps réel duplex



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
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 *	mineures	Février 2017	<ul style="list-style-type: none">• Changement de format de présentation de la méthode• Amélioration du diagramme décisionnel• Mise à jour de la dénomination scientifique de l'organisme cible (<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>) selon les nouvelles règles nomenclaturales en mycologie• Ajout d'un réactif (mix d'amplification) validé pour la réaction de PCR en temps réel• 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 06 octobre 2016 au 06 novembre 2016 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 méthode a été initialement mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV, 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) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Hymenoscyphus fraxineus* (loos *et al.* 2009b). Ce travail a bénéficié de la collaboration d'O. Holdenrieder (ETH Zurich, Suisse) et de T. Kowalski (Université de Cracovie, Pologne).

La méthode 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.....	9
5.4 Kit de PCR en temps-réel.....	9
5.5 Autres consommables à usage unique.....	10
5.6 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	11
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	12
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
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	13
8.3 Test de détection par PCR en temps réel duplex	14
9 Résultats.....	15
9.1 Contrôle de la validité des résultats	15
9.2 Calculs et expression des résultats	16
10 Caractéristiques de performance de la méthode	17
Annexe 1 : symptômes d' <i>H. fraxineus</i> sur frêne	20
Annexe 2 : schéma décisionnel	21
Bibliographie.....	22



Introduction

Hymenoscyphus fraxineus (ex *Chalara fraxinea*) est un champignon ascomycète qui provoque un grave dépérissement du frêne (*Fraxinus excelsior* et *F. angustifolia*) en Europe. La maladie est caractérisée par un dépérissement rapide de la couronne du frêne, associé à la présence de chancres sur le tronc, les rameaux ou les brindilles, et au flétrissement de branches entières. Les arbres de tous âges peuvent être atteints, qu'ils soient situés en plantations, en forêts naturelles, comme essence ornementale ou en pépinières. Son épidémiologie est encore mal connue, mais le parasite peut se disséminer à longue distance via le transport de matériel infecté (plant de pépinière, bois de chauffage, etc.).



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.

Bien que ce parasite ne fasse pas l'objet de réglementation phytosanitaire, il est fortement recommandé de manipuler les formes viables de cet agent pathogène à possible dissémination aérienne dans des conditions de confinement de type NS3, surtout si le laboratoire d'analyse se situe en zone indemne de la maladie.

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 *H. fraxineus* dans des tissus végétatifs de frêne. La présence de *H. fraxineus* est mise en évidence par un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *H. fraxineus* 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 *H. fraxineus* 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 concerne les semis, plants et sujets adultes de *Fraxinus* spp. 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.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été initialement mise au point et validée sur des tissus végétatifs de *Fraxinus* spp. présentant des symptômes.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : La méthode s'applique sur tissus végétatifs de toute taille (tissus nécrotiques de semis ou plantules, tissus sous corticaux de branches ou tronc, pétioles, bourgeons, etc.) de *Fraxinus* spp.

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

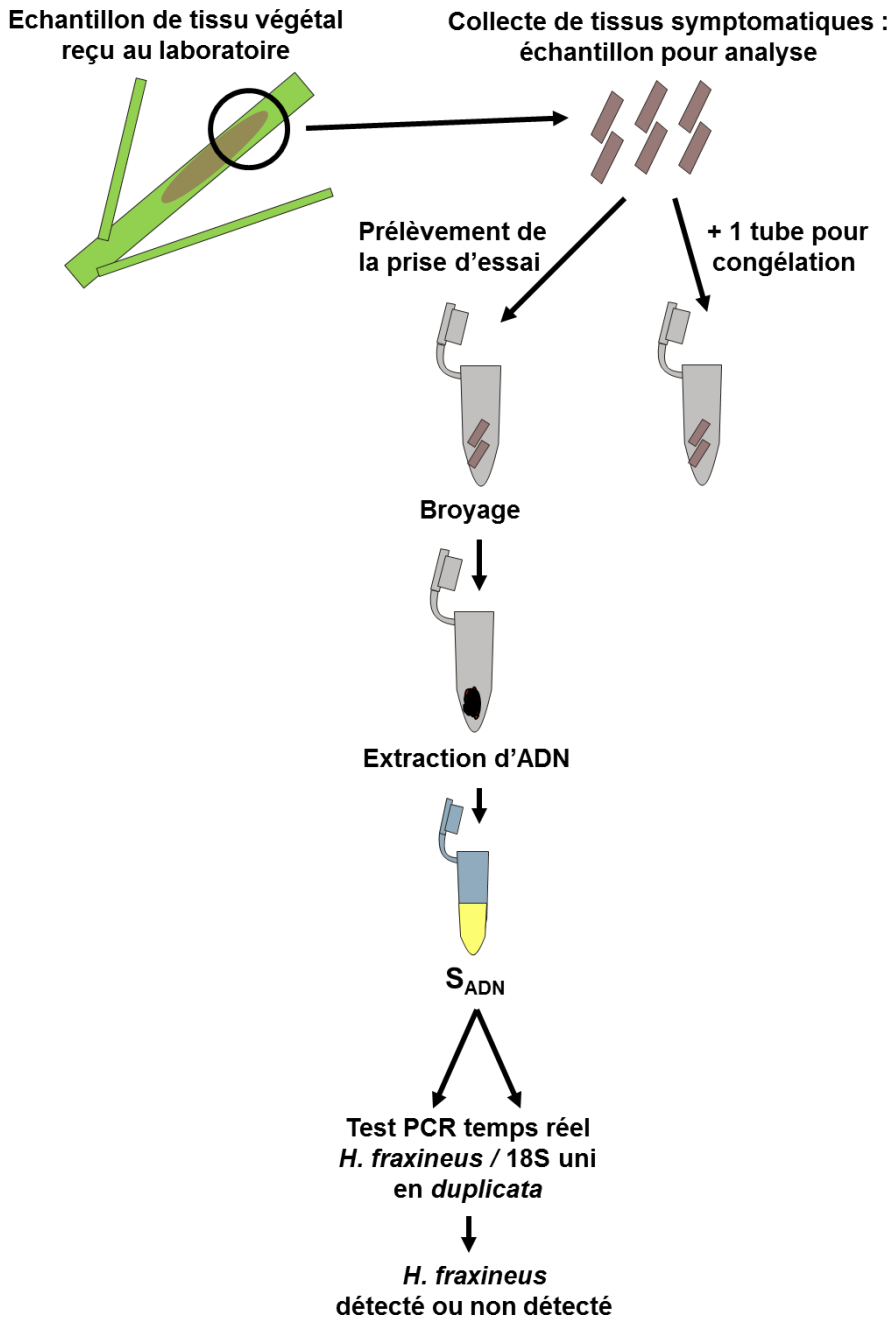
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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, 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 NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) (loos *et al.*, 2009b, dossier LNR de validation de la méthode MOA001).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce sonde	ou Sequence (5'-3')
<i>H. fraxineus</i>	Cfrax-F ^a	ATTATATTGTTGCTTTAGCAGGTC
	Cfrax-R ^a	TCCTCTAGCAGGCACAGTC
	Cfrax-P ^a	[FAM]-CTCTGGGCGTCGGCCTCG-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F ^b	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA
	18S uni-R ^b	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P ^b	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

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

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

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.*, 2009b, dossier LNR de validation de la méthode MOA001). Le kit qPCR Mastermix No ROX (Eurogentec) a été également validé (dossier LNR de validation de la méthode MOA001).



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),
- 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 (loos *et al.*, 2009a). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test *H. fraxineus* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans la même réaction que le test de détection de *H. fraxineus* (duplex). 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 (tissus végétatifs de *Fraxinus*) 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 26.6 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA001).*
- 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 (1er type de faux positif). Il



est possible de remplacer cet échantillon vide par un échantillon de tissus de frêne reconnu non contaminé par *H. fraxineus* (témoin négatif de processus, T_{PROC}). L'un ou l'autre sera testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel Cfrax-F/-R/-P pour vérifier l'absence de contamination croisée entre échantillons ou de contamination externe lors de la phase d'extraction d'ADN.

- Un témoin positif T_{+18S frêne} 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 frêne} 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 de frêne, ou d'une solution d'ADN de frêne 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}) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel Cfrax-F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *H. fraxineus* puisse avoir été détectée dans un échantillon par ce protocole. Ce T_{+LOD} est constitué d'une solution calibrée d'ADN génomique d'une souche référencée de *H. fraxineus* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR Cfrax-F/-P/-R. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le T_{+LOD} peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la limite de détection du test a été déterminée à 4840 copies plasmidiques de cible par tube de PCR avec le kit Mastermix No ROX Eurogentec (Dossier LNR de validation de la méthode MOA001)*
- 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 Cfrax-F/-R/-P. 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.

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 » et « JOE » 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 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 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 3 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 préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. La prise d'essai s'effectuera sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *H. fraxineus* ou éventuellement des symptômes douteux.

Les prélèvements de tissu s'effectuent dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, cibler les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.

Les fragments de tissus sont ensuite découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérilisée en tronçons les plus petits possible (si possible ≤ 2 à 3 mm d'arête). Ces fragments sont ensuite mélangés puis transférés dans un microtube de 2 ml en veillant à ne pas dépasser un volume de fragments d'environ 400 à 500 μ l (se fier aux graduations du tube). À cette étape, 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. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
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 environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.



- À la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
- 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.
- 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'élué. 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 duplex

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection Cfrax-F/-R/-P

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
qPCR mastermix No ROX (Eurogentec)	1 X
Amorce sens Cfrax-F	0.3 µM
Amorce antisens Cfrax-R	0.3 µM
Sonde Cfrax-P	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

- Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 ml.
- Les différents composants sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de microcônes stériles à embout filtre.
- Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
- 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.

- 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 testés en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T_{-} , on substitue à la S_{ADN} 2 μ l 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 Cfrax-F/-R/-P

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *H. fraxineus* sont les suivants (loos *et al.*, 2009b) :

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	65°C	55 sec puis mesure de la fluorescence FAM et JOE	

* 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 répliquats de T_{-extr} n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN} .



- Aucun des réplicats de T- (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S_{ADN} .
- Les réplicats de T_{+LOD} ont chacun généré un niveau de fluorescence « FAM » supérieur à la ligne de seuil déterminée => les conditions de PCR et la composition du mélange réactionnel de PCR ont permis d'amplifier spécifiquement et avec une performance optimale la séquence cible chez *H. fraxineus*.

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 le test Cfrax-F/-R/-P, la prise d'essai considérée est dite positive pour *H. fraxineus*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « **H. fraxineus détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-écrite.
- Si un seul réplicat parmi les deux de la prise d'essai est positif pour le test Cfrax-F/-R/-P, refaire un test PCR Cfrax-F/-R/-P en *duplicata* (le résultat de ce nouveau test sera analysé comme un nouvel extrait). Si le même résultat est obtenu, contacter le LNR.
- Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test Cfrax-F/-R/-P 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 *H. fraxineus*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « **H. fraxineus non détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode.
- Si aucun des réplicats de la S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test Cfrax-F/-R/-P 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 *H. fraxineus*. 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 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** » selon la méthode ci-décrite, 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 2 résume ces conditions.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	L'efficacité de la réaction monoplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'ADN de frêne a été évaluée à 0,99 avec le Mastermix No ROX (Eurogentec) et à 1,01 avec le Core kit No ROX (Eurogentec). Le R ² calculé pour les 2 gammes est de 0,99.
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 484 et 4840 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR (soit 2,42 et 24,2 cp/μL) pour une réaction monoplex avec dilution dans du TE (1x) en utilisant respectivement le Core kit No ROX (Eurogentec) et le Mastermix No ROX (Eurogentec). Le seuil de détection de la cible est affecté par le type de pré-mix utilisé, cependant, le résultat qualitatif obtenu à partir de cibles d'ADN diluées à des concentrations proches de la limite de détection n'est pas affecté.
Spécificité analytique	La spécificité analytique a été évaluée sur 20 isolats de <i>H. fraxineus</i> , 34 isolats de champignons génétiquement proches de <i>H. fraxineus</i> ou qui partagent le même hôte et sur 5 extraits d'ADN provenant de différents organes de frêne sain, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec) et le Mastermix No ROX (Eurogentec). Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique.
Inclusivité	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 d' <i>H. fraxineus</i> (20 isolats) de différentes provenances géographiques, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec) et le Mastermix No ROX (Eurogentec). Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif.



Répétabilité et reproductibilité	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations proches de la limite de détection et sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de frêne naturellement contaminé, en utilisant le mastermix No ROX (Eurogentec). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :</p>					
	Cible	concentration (en copies plasmidiques par tube PCR)	CV (%)		résultat qualitatif	
			répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité
	Solution plasmidique	48400	0.96	1.08	+	+
		4840	1.70	1.63	+	+
484 (LOD)		2.19	3.32	+	+	
Echantillon	nd	0.89	2.56	+	+	
<p>Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%. Le test est donc répétable et reproductible.</p>						
Robustesse	<p>La robustesse du test a été évaluée d'une part en faisant varier le volume d'ADN matrice et le volume réactionnel de $\pm 10\%$ et en testant 12 réplicats d'une solution plasmidique calibrée (à concentration LOD), en utilisant le Mastermix kit No ROX (Eurogentec). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :</p>					
	Paramètre	volume (μ L)	Ct moyen (\pm SD) [§]	résultat qualitatif		
	volume d'ADN matrice	1,8	37.16 \pm 0.85 ^b	+		
		2*	36.50 \pm 0.51 ^b	+		
		2,2	35.50 \pm 0.77 ^a	+		
volume de mix réactionnel	18	35.30 \pm 0.36 ^a	+			
	20*	35.78 \pm 0.95 ^a	+			
	22	36.00 \pm 0.61 ^a	+			
<p>[§] les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Fisher. * volume préconisés par la méthode</p> <p>En faisant varier les volumes d'ADN matrice ou de mix réactionnel, le test reste robuste, avec 100% de résultats positifs.</p> <p>La robustesse a par ailleurs été testée en faisant varier la température d'hybridation de $\pm 2^\circ$C en testant 5 réplicats d'une solution plasmidique calibrée à 2 concentrations différentes (LOD et 100xLOD) et 10 réplicats d'ADN extrait de <i>Hymenoscyphus albidus</i>, espèce proche de <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>, en utilisant le Mastermix No ROX (Eurogentec).</p>						



Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Cible	température (°C)	Ct moyen (±SD) [§]	résultat qualitatif
48400 copies plasmidiques par tube PCR (100x LOD) de la cible chez <i>H. fraxineus</i>	63	25.00±0.12 ^a	+
	65*	26.68±1.65 ^b	+
	67	31.42±0.38 ^c	+
484 copies plasmidiques par tube PCR (LOD) de la cible chez <i>H. fraxineus</i>	63	31.05±0.51 ^a	+
	65*	33.98±0.41 ^b	+
	67	39.73±0.59 ^c	-
ADNg de <i>H. albidus</i>	63	>40 ^a	-
	65*	>40 ^a	-
	67	>40 ^a	-

[§] les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Tukey.

* température préconisés par la méthode

En faisant varier la température d'hybridation de -2°C, le test reste robuste avec 100% de résultats positifs pour les cibles attendues positives et 100% de résultats négatifs avec la cible attendue négative.

Par contre, si la température dérive d'au moins 2°C supplémentaires, le test n'est pas suffisamment robuste pour garantir une sensibilité analytique suffisante à des niveaux de cibles proches de la limite de détection. Cependant, l'utilisation d'une carte de contrôle du témoin positif à la concentration 100x LOD montrera cette dérive dans la mesure où les Ct moyen obtenus sont significativement supérieurs aux Ct moyen obtenus à la température de consigne. De plus, l'absence de valeur de Ct obtenue à la concentration LOD pour 4 des 5 réplicats serait indicatrice d'une dérive de température.

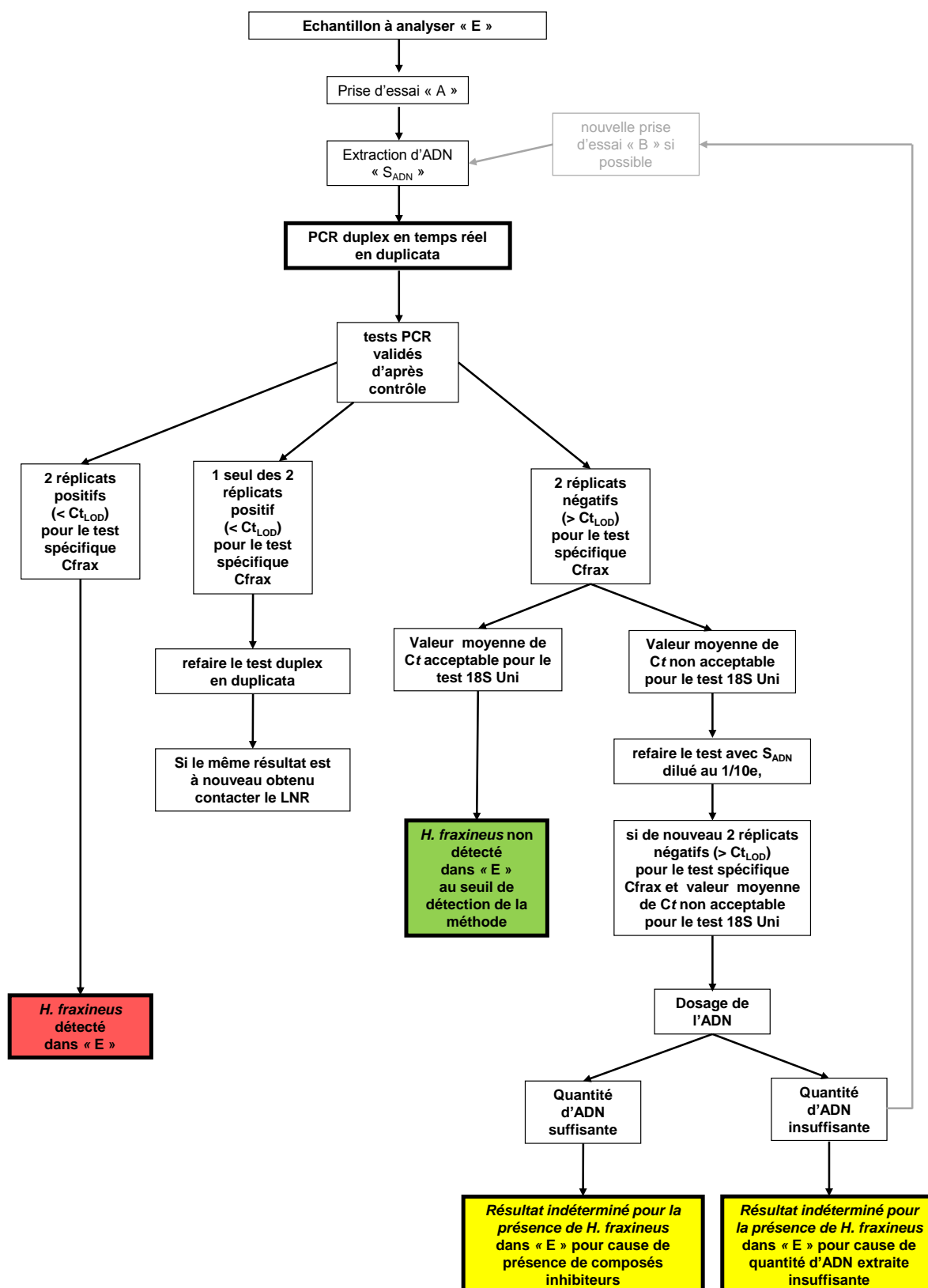


Annexe 1 : symptômes d' *H. fraxineus* sur frêne





Annexe 2 : schéma décisionnel





Bibliographie

Ioos R, Fourier C, Iancu G, Gordon TR, 2009a. 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, 582-90.

Ioos R, Kowalski T, Husson C, Holdenrieder O, 2009b. Rapid *in planta* detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. **European Journal of Plant Pathology** 125, 329-35.