



Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 031 - Version 1c

Mai 2015

Détection de *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae* par PCR en temps réel

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 codifications et versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
MF/18/04a		2004	Version initiale
MOA031 v1a	majeure	Février 2013	Passage de la méthode en PCR en temps réel
MOA031 v1b	mineure	Mai 2014	Passage de l'analyse en <i>triplicata</i> à l'analyse en <i>duplicata</i> afin de se mettre en adéquation avec les exigences de la MOA 022. Intégration à titre indicatif de certaines caractéristiques de performance de la méthode, ainsi que la description de certains réactifs et matériels utilisés dans le cadre de la validation initiale de la méthode par le LNR
MA 031 v1c	mineure	25 février 2015	Étape de broyage plus détaillée afin de rendre la rendre plus explicite et rectification de la description d'un contrôle réactionnel concernant le test visant à évaluer la qualité d'extraction d'ADN



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, CS 40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente méthode a été mise au point par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux, en collaboration avec l'UMR INRA/Université de Lorraine Interactions arbres microorganismes et le Canadian Forest Service (Québec, Canada).

Le travail de relecture et de révision 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 Kit d'extraction d'ADN de plante.....	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
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.....	14
9 Résultats	16
9.1 Contrôle qualité	16
9.2 Calculs et expression des résultats	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Annexe 1 : Schéma décisionnel	20
Bibliographie	21



Introduction

Cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

Melampsora medusae Thümen est un des agents responsables de la rouille du peuplier. Cette espèce produit des lésions sporulantes (urédies) à la surface des feuilles provoquant une défoliation précoce et une réduction de la vitesse de croissance des peupliers, pouvant entraîner la mort dans des cas d'infections sévères. *Melampsora medusae* est originaire d'Amérique du nord et s'est dispersée sur d'autres continents (Frey *et al.* 2005; EPPO 2009). En Europe, sa présence n'a été rapportée que ponctuellement et dans des zones restreintes, en France, Belgique et Portugal (Frey *et al.* 2005; EPPO 2009). Cette espèce a été classée comme parasite de quarantaine par l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) et par l'Union Européenne (Anonyme 2000).

Deux formes spéciales ont été décrites, morphologiquement indistinctes : *M. medusae* f. sp. *deltoidae* uniquement pathogène sur les espèces de peupliers de la section *Aigeiros*, incluant les peupliers cultivés tels *P. deltoides* and *P. x euramericana*, et *M. medusae* f. sp. *tremuloidae* uniquement pathogène sur les espèces de peupliers de la section *Populus*, incluant les peupliers sauvages tels *P. tremuloides* (Shain, 1988).



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 nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés 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 S_{ADN} peuvent être éliminés sans traitement particulier.

Conservation des reliquats de matériels utilisés

L'analyse est réalisée sur la totalité de l'échantillon reçu au laboratoire. Il n'y a donc pas de reliquat d'échantillon pour analyse pour cette méthode d'analyse. L'extrait d'ADN obtenu à partir de l'échantillon pour analyse doit être conservé pendant au minimum une année.



1 Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *M. medusae* f. sp. *deltoidae* (*Mmd*), la forme spéciale économiquement dommageable, à partir d'un échantillon d'urédospores récoltées sur feuilles de peuplier présentant des symptômes de rouille au stade urédien. Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter *M. medusae* f. sp. *deltoidae* dans la limite du seuil de détection de la technique employée mais pas de le quantifier dans l'échantillon analysé. Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *M. medusae* f. sp. *deltoidae* ou contaminé à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés par *M. medusae* f. sp. *deltoidae*. La méthode présentée est à utiliser pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires en surveillance du territoire, à l'importation ou à l'exportation de végétaux.

Un test de PCR en temps réel (qPCR) utilisant une sonde d'hydrolyse et un couple d'amorces dont la combinaison est spécifique de *M. medusae* f. sp. *deltoidae* est proposé dans cette méthode. De plus, la méthode inclut un test qPCR utilisant une sonde d'hydrolyse et un couple d'amorces dont la combinaison est spécifique du genre *Melampsora* permettant d'évaluer la qualité de l'extrait d'ADN testé.

La méthode s'applique sur des échantillons d'urédospores de *Melampsora* récoltés dans des microtubes stériles de 2 mL. Un échantillon individuel d'urédospores dans un microtube sera utilisé intégralement pour l'analyse et représentera la prise d'essai.

2 Documents de référence

- [1] **MOA 022** : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes
- [2] **MF/04/18** : Détection de *Melampsora medusae* Thümen sur feuilles par la technique d'amplification par polymérisation en chaîne.

3 Termes, sigles et définitions

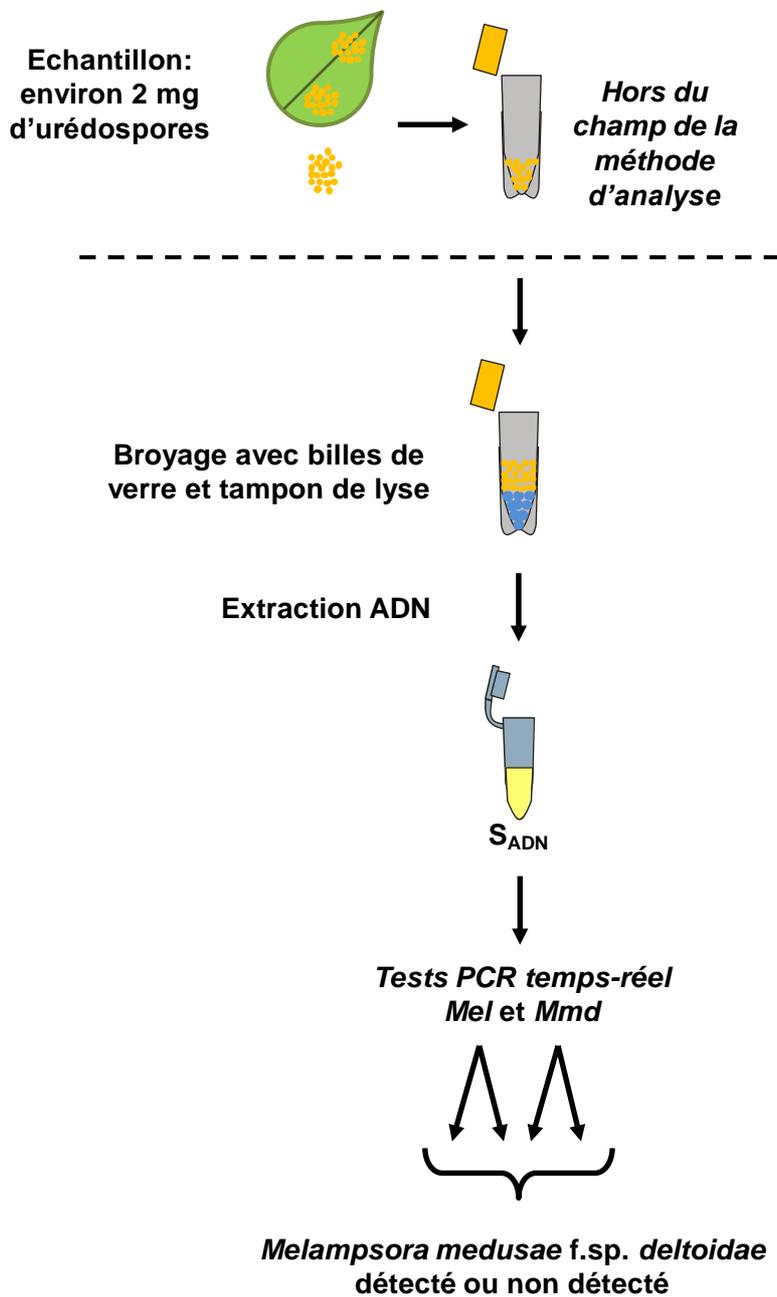
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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 des méthodes officielles.



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.

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 interférer 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 optimales.

5.1 Eau

L'eau ultra pure (EUP) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire.

5.2 Kit d'extraction d'ADN de plante

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 type de kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) (Boutigny *et al.* (2013a), dossier LNR de validation de la méthode MOA031).

5.3 Oligonucléotides

Cible	Amorce ou sonde	Sequence (5'-3')
<i>M. medusae</i> f. sp. <i>deltoidea</i> *	Mmd-F	GTT GGA AAA AGG GCT CGA G
	Mmd-R	AGC TTA CTA CGC GTT CCT CA
	Mmd-P	FAM-TTG GGA CCT CGA ATA CAA CGC TC-BHQ1
genre <i>Melampsora</i> **	Mel-F	TGA TAC GGT TTC TAA GAG TCG AG
	Mel-R	CAT CTT TCC CTC ACG GTA CTT G
	Mel-P	JOE-TTG GGA ATG CAG CTC AAA GTG GG-BHQ1

* Boutigny *et al.* (2013a)

** Boutigny *et al.* (2013b)



Les sondes marquées, sous forme concentrée ou diluée sont conservées et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière, ou en les protégeant de cette dernière (risque de photolyse). Eviter de trop fréquents cycles de congélation/décongélation, par exemple en préparant des parties aliquotes à nombre d'utilisations limité. D'autres fluorophores rapporteurs peuvent être utilisés pour chaque sonde, 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) (Boutigny *et al.* (2013a), dossier LNR de validation de la méthode MOA031).

5.5 Autres consommables à usage unique

- Microcônes stériles à filtre de volumes adaptés
- Microtubes stériles de 2 mL
- Microtubes ou capillaires stériles pour qPCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, en barrette de 4 ou 8 puits ou en plaque de 96 puits.
- Billes de broyage stériles en verre de 0,75 à 1 mm de diamètre pour broyage en microtube de 2mL ou tout autre consommable permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente.

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 requiert l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- i) l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- ii) les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- iii) les volumes prélevés à l'aide des micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- iv) l'extrait d'ADN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- v) il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.

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

- **Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur. Il sera réalisé pour chaque prise d'essai.** Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde Mel-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 *Melampsora* est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant. Une S_{ADN} sera dite



positive pour le test *Mel* si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) ou le Ct moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (urédospores) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct moyen pour le test Mel a été déterminée à 26.2 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA031).*

- **Un témoin négatif d'extraction (T_{-extr}).** Il 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 pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Il 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 d'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 du test *Mel* (T_{+Mel}).** Il sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel *Mel*. Il permet de vérifier que la réaction PCR *Mel* s'est effectuée de façon correcte. Ce T_{+Mel} est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR 28S *Mel*-F/-R ou d'une solution d'ADN de *Melampsora* sp. 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}).** Il sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel *Mmd*. 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 *Mmd* 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 *Mmd* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR 28S *Mmd*-F/-R. En pratique, le T_{+LOD} peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas. Ce T_{+LOD} doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la limite de détection du test a été déterminée à 240 copies plasmidiques de cible par tube de PCR (Boutigny et al., 2013a ; dossier LNR de validation de la méthode MOA031).*
- **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 *Mmd*. 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 norme XP V03-043 et la MOA022.



L'utilisation de ces contrôles et témoins permet de s'affranchir de contrôles métrologiques classiques (volumes, pH, résistivité, température, certificats, etc.), l'interprétation des résultats obtenus avec les différents types de contrôles et témoins permettant de valider ou non *a posteriori* l'ensemble du matériel, des consommables, de la manipulation et des résultats. En cas d'utilisation d'un thermocycleur à bloc, l'homogénéité de ce dernier devra être démontrée expérimentalement ou par vérification métrologique.

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.

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.
- 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.
- Hottes à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour *i)* préparation du mélange réactionnel et *ii)* chargement des échantillons dans les tubes de PCR (ou à défaut deux zones de travail clairement séparées)

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons doivent arriver au laboratoire en bon état (propres, fermés, intacts, ...). Dans le cas contraire, le laboratoire émet une réserve sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire.

Les échantillons pour analyse devraient idéalement être constitués d'environ 2 mg d'urédospores. L'analyse pourra toutefois être réalisée sur une quantité de prélèvement moindre si peu de matériel biologique est disponible sur le terrain. En revanche, la quantité de prélèvement ne doit pas dépasser le haut de la partie arrondie du fond du microtube (voir image), car le broyage ne pourrait alors s'effectuer correctement.





7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les prises d'essai en microtube peuvent être conservées congelées (<-18°C) jusqu'à 6 mois avant analyse.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

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

Un échantillon correspond à un regroupement de plusieurs prélèvements ponctuels effectués à partir de grattage d'urédies sur une ou plusieurs feuilles bien infectées de manière à obtenir une quantité suffisante équivalant à environ 2 mg d'urédospores au fond du microtube de 2 mL stérile (soit environ 2 mm de hauteur de poudre d'urédospores au fond du tube).

Un lot correspond à un ensemble d'échantillons individuels prélevés dans la même pépinière.

La fermeture hermétique du microtube sera vérifiée. Les microtubes seront individuellement identifiés à l'aide d'un marqueur permanent et leur référence sera reportée sur une fiche de prélèvement. Les échantillons peuvent être conservés au congélateur avant envoi. L'envoi devra s'effectuer par transport rapide à destination du laboratoire d'analyse.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination par voie solide ou liquide doit être de type NS3, dans la mesure où le laboratoire d'analyse est situé en zone indemne. A défaut, un recueil et une destruction des déchets solides et liquide sera suffisante pour prévenir toute dissémination de l'organisme cible.

Les échantillons reçus non correctement conditionnés (trop remplis, mal codifiés, non hermétiquement fermés, brisés, ...) seront autoclavés pour des raisons de précaution phytosanitaire.

Les tubes hermétiquement fermés seront obligatoirement plongés et agités pendant 30 secondes dans une solution désinfectante d'eau de javel à 0.5% puis séchés avec du papier absorbant. Cette phase permet d'éliminer toute trace de contamination externe du tube par *M. medusae* qui pourrait se produire lors de la mise en tube.

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

L'objectif du broyage de la prise d'essai est de permettre de l'homogénéiser et de faciliter la libération d'un maximum d'ADN total lors de l'incubation dans le tampon de lyse.

- Centrifuger quelques secondes le microtube contenant la prise d'essai jusqu'à atteindre la vitesse de 7000 g afin de concentrer les spores au fond du tube. Ouvrir le microtube et y ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN.



- Remettre délicatement les spores en suspension par aspiration / refoulement à l'aide de la micropipette puis transférer l'intégralité des spores et du tampon de lyse dans un tube de Lysing Matrix C (MP Biomedicals) ou dans un tube stérile 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). 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).
- Placer le microtube sur le portoir du broyeur et lancer l'agitation/broyage à deux reprises environ 1 min à une fréquence d'agitation d'environ 6.5 unités (Fast-Prep, MP Biochemicals). Si un autre système de broyage est utilisé, utiliser les paramètres de broyage appropriés permettant d'obtenir une qualité de broyage équivalente.
- Centrifuger le microtube quelques secondes après le broyage pour faire descendre l'échantillon au fond du tube et réduire la mousse. 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 précipiter.
- Suivre ensuite le protocole d'extraction et de purification indiqué par le fabricant, après avoir brièvement centrifugé les tubes afin de limiter les risques de projection à leur ouverture.
- A la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total extrait est élué dans 100 µL de tampon d'éluion (ou à défaut dans le volume final de tampon d'éluion recommandé par le fabricant). Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel (S_{ADN}).

Après extraction d'ADN, les extraits sont conservés par congélation (<-18°C) au minimum pendant une année. .

8.3 Test de détection par PCR en temps réel

Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection *Mmd*.

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 µl) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µl
qPCR core kit no ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 µM
DNA Polymerase	0.025 U/µl
Amorce sens <i>Mmd</i> -F	0.1 µM
Amorce antisens <i>Mmd</i> -R	0.2 µM
Sonde <i>Mmd</i> -P	0.05 µM



Préparation et distribution du mélange réactionnel de détection *Mel*.

La composition du mélange réactionnel (volume réactionnel de 20 μ l) est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 μ l
qPCR core kit no ROX (Eurogentec)	
Reaction Buffer	1 X
Chlorure de Magnésium	5 mM
dNTPs mix	4 x 200 μ M
DNA Polymerase	0.025 U/ μ l
Amorce sens <i>Mel</i> -F	0.1 μ M
Amorce antisens <i>Mel</i> -R	0.1 μ M
Sonde <i>Mel</i> -P	0.3 μ M

1. Le mix se prépare dans un microtube stérile de 1.5 ou 2 mL,
2. Les différents composants, excepté la polymérase à ADN, 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 avec 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 μ L par microtube.

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

L'addition des S_{ADN} à tester ainsi que des solutions d'ADN servant de témoins s'effectuera de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mélange réactionnel. Il est obligatoire d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.

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 μ L par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout avec filtre.
2. Les S_{ADN} des différents contrôles sont ajoutées et testées en *duplicata* : T_{-extr} , T_{+LOD} , etc. Pour le T- (ou NTC), 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 correspondant 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 *Mmd* / *Mel*

Les différents paramètres de la PCR en temps réel pour la détection de *Mmd* et de *Mel* sont les suivants :

Etape	Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale / activation de la polymérase Hotstart	Suivre les préconisations du fournisseur	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec
3	Hybridation - polymérisation	62°C	45 sec puis mesure de la fluorescence FAM ou JOE

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

9 Résultats

9.1 Contrôle qualité

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.

Pour chaque fluorophore, une ligne de fluorescence seuil (« threshold line ») sera déterminée. Elle constitue la limite minimale de fluorescence à atteindre pour qu'un signal de fluorescence émis soit significativement supérieur au signal du bruit de fond (représenté par la « base line »). Le cycle théorique estimé à partir duquel le niveau de fluorescence généré par un échantillon franchit cette ligne seuil avec une cinétique de nature exponentielle correspond au Ct.

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

- Aucun des répliquats du 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.
- Aucun des répliquats des 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 et l'ajout des S_{ADN}.
- Les répliquats du 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 *Mmd*.

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, toute 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 leurs réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, observer le Ct moyen du contrôle $T_{+LOD} = Ct_{LOD}$. Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct moyen est inférieur à Ct_{LOD} seront considérés comme positifs. Il a été en effet démontré que la détection d'une seule spore de *Mmd* dans un mélange de 800 000 spores de *M. larici-populina* ne générerait pas de Ct supérieur au Ct moyen généré à la limite de détection (Ct_{LOD}) (cf Boutigny et al., 2013a ; dossier LNR de validation de la méthode MOA031).

- a) Si les deux réplicats de la prise d'essai sont positifs pour le test *Mmd*, la prise d'essai considérée est dite positive pour *Mmd*. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « **Melampsora medusae f. sp. deltoidae détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-décrite.
- b) Si un réplicat parmi les deux de la prise d'essai est positif pour le test *Mmd*, refaire un test en *duplicata*. Si le même résultat est obtenu, des analyses complémentaires devront être entreprises pour vérifier la nature de l'amplicon (séquençage) et s'assurer de l'absence de contamination.
- c) Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test *Mmd* et que la S_{ADN} de la prise d'essai est positive pour le test *MeI*, l'échantillon pour analyse est dit négatif pour *Mmd*. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « **Melampsora medusae f. sp. deltoidae non détecté dans l'échantillon analysé** » en citant la méthode ci-décrite et en précisant le seuil de détection de la méthode¹.
- d) Si aucun des deux réplicats de S_{ADN} de la prise d'essai n'est positif pour le test *Mmd* et que la S_{ADN} correspondante est aussi négative pour le test *MeI*, la prise d'essai est dite « non utilisable » pour la recherche de *Mmd*. Ce cas de figure traduit *i)* une mauvaise extraction de l'ADN total de la prise d'essai considérée, ou *ii)* une présence trop importante de composés à effet inhibiteur dans S_{ADN} . Dans le premier cas *i)*, 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. Si ce n'est pas le cas, l'extraction d'ADN n'a pas été correctement réalisée, le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionnera la cause de l'indétermination.. Dans le deuxième cas *ii)*, une dilution de la S_{ADN} doit être analysée pour tenter de diminuer l'effet inhibiteur. Si l'effet inhibiteur ne peut être levé, le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé » selon la méthode ci décrite, et mentionner la cause de l'indétermination.

Le diagramme décisionnel présenté en annexe I résume ces conditions.

¹ Le seuil de détection est soit celui de la méthode globale s'il a pu être déterminé, soit celui de la réaction d'amplification par PCR (T_{+LOD}). Dans les deux cas le seuil doit être déterminé expérimentalement par le laboratoire, dans ses propres conditions



10 Caractéristiques de performance de la méthode

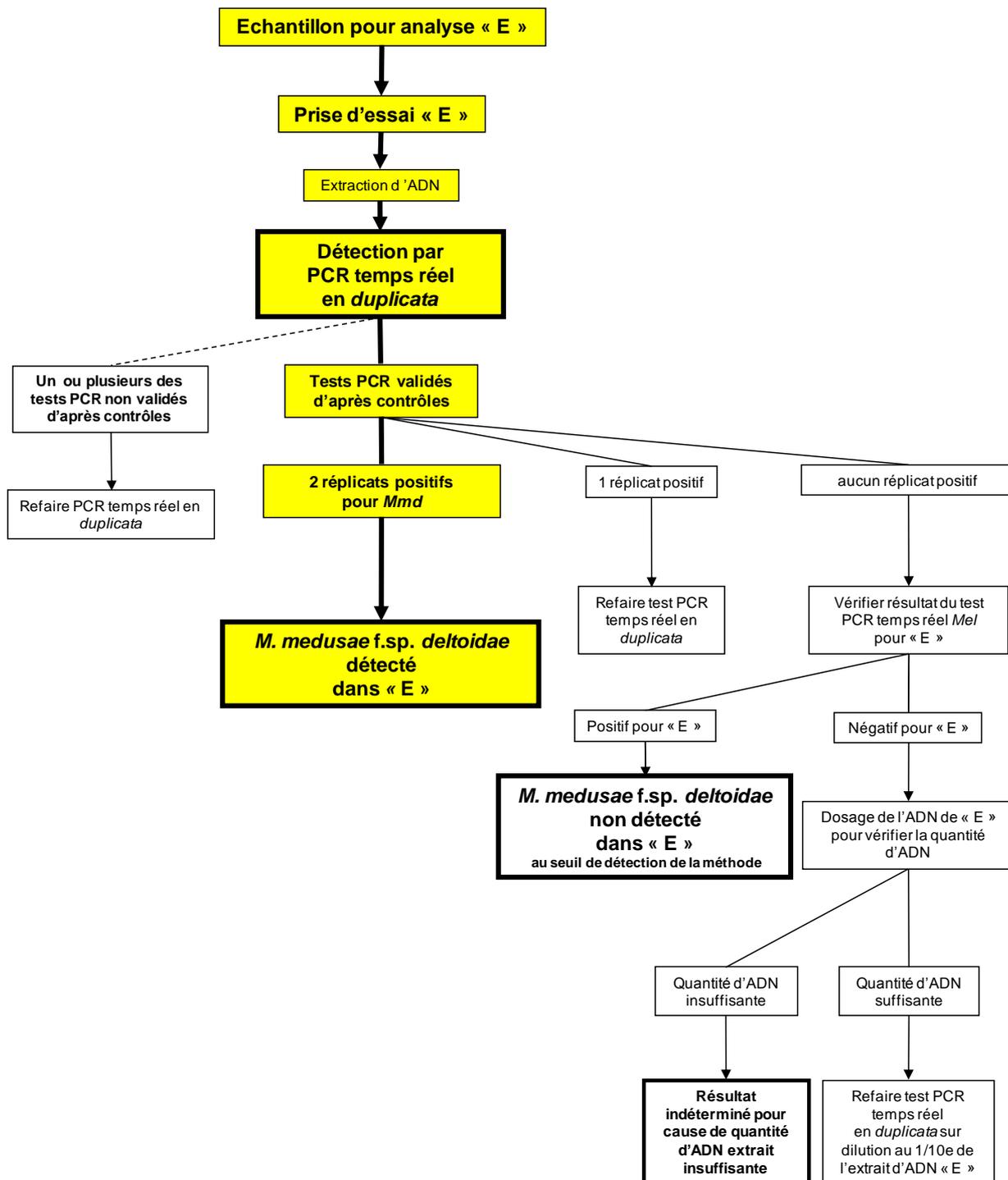
Caractéristique de performance	Résultats obtenus																																						
Caractéristiques de la réaction de qPCR	<p>L'efficacité de réaction a été évaluée à 0.95 quand la gamme est préparée dans de l'eau et à 0.93 quand elle est préparée dans de l'ADN de <i>Mlp</i> (<i>Mlp</i> 97EA3 à 0.5 ng/μL).</p> <p>Le seuil de détection de la cible n'est pas affecté par la présence d'ADN de <i>Mlp</i> d'un point de vue qualitatif lorsque l'on teste des solutions plasmidiques calibrées, et la limite de détection reste la même.</p> <p>Le R² calculé pour la gamme diluée dans de l'eau ultra pure est 0.99.</p>																																						
Sensibilité analytique	<p>La sensibilité analytique a été estimée à 240 copies plasmidiques d'ADN cible par tube de PCR pour une réaction monoplex <i>Mmd</i> avec dilution dans de l'eau ultrapure.</p>																																						
Spécificité analytique	<p>Les amorces et sondes suivantes ont été optimisées pour leur spécificité <i>in silico</i> et leurs caractéristiques thermodynamiques :</p> <p>Tableau 2. Liste des amorces et des sondes développées dans cette étude. (d'après Boutigny et al., 2013a)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Target</th> <th>Name</th> <th>Sequence (5'-3')</th> <th>Tm (°C)^a</th> <th>Position^b</th> <th>Product size (bp)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3"><i>M. medusae</i> f. sp. <i>deltoidae</i></td> <td>Mmd-F</td> <td>GTTGGAAAAAGGGCTCGAG</td> <td>59,8</td> <td>282-300</td> <td>94</td> </tr> <tr> <td>Mmd-R</td> <td>AGCTTACTACGCGTTCCTCA</td> <td>57,8</td> <td>356-375</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mmd-P</td> <td>FAM-TTGGGACCTCGAATACAACGCTC-BHQ1</td> <td>66,6</td> <td>328-350</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="3"><i>Melampsora</i> genus</td> <td>Mel-F</td> <td>TGATACGGTTTCTAAGATCGAG</td> <td>57,7</td> <td>196-218</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>Mel-R</td> <td>CATCTTCCCTCACGGTACTTG</td> <td>60,9</td> <td>294-315</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mel-P</td> <td>JOE-TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGG-BHQ1</td> <td>69,4</td> <td>223-245</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>L'évaluation de la spécificité analytique <i>in silico</i> par blast sur GenBank a été démontrée.</p> <p>La spécificité analytique du test a été évaluée <i>in vitro</i> avec succès sur une gamme appropriée de différentes espèces de <i>Melampsora</i>.</p>	Target	Name	Sequence (5'-3')	Tm (°C) ^a	Position ^b	Product size (bp)	<i>M. medusae</i> f. sp. <i>deltoidae</i>	Mmd-F	GTTGGAAAAAGGGCTCGAG	59,8	282-300	94	Mmd-R	AGCTTACTACGCGTTCCTCA	57,8	356-375		Mmd-P	FAM-TTGGGACCTCGAATACAACGCTC-BHQ1	66,6	328-350		<i>Melampsora</i> genus	Mel-F	TGATACGGTTTCTAAGATCGAG	57,7	196-218	120	Mel-R	CATCTTCCCTCACGGTACTTG	60,9	294-315		Mel-P	JOE-TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGG-BHQ1	69,4	223-245	
Target	Name	Sequence (5'-3')	Tm (°C) ^a	Position ^b	Product size (bp)																																		
<i>M. medusae</i> f. sp. <i>deltoidae</i>	Mmd-F	GTTGGAAAAAGGGCTCGAG	59,8	282-300	94																																		
	Mmd-R	AGCTTACTACGCGTTCCTCA	57,8	356-375																																			
	Mmd-P	FAM-TTGGGACCTCGAATACAACGCTC-BHQ1	66,6	328-350																																			
<i>Melampsora</i> genus	Mel-F	TGATACGGTTTCTAAGATCGAG	57,7	196-218	120																																		
	Mel-R	CATCTTCCCTCACGGTACTTG	60,9	294-315																																			
	Mel-P	JOE-TTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGG-BHQ1	69,4	223-245																																			
Inclusivité	<p>L'inclusivité du test qPCR a été démontrée <i>in silico</i> par BLAST sur la base de données GenBank et <i>in vitro</i> sur une gamme représentative de 39 souches de <i>Mmd</i>.</p>																																						
Répétabilité et reproductibilité	<p>Tableau 3. Coefficients de variation (CV) intra et inter-test basés sur la moyenne des valeurs de Ct (d'après Boutigny et al., 2013a)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cible</th> <th rowspan="2">concentration de la cible (cp/μL)</th> <th rowspan="2">résultat qualitatif</th> <th colspan="2">Moyenne des Ct (±SD)</th> <th colspan="2">CV (%)</th> </tr> <tr> <th>intra-test</th> <th>inter-test</th> <th>intra-test</th> <th>inter-test</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">Mmd</td> <td>240 10²</td> <td>+</td> <td>22,34 ± 0,14</td> <td>22,34 ± 0,21</td> <td>0,63</td> <td>0,94</td> </tr> <tr> <td>240 10¹</td> <td>+</td> <td>25,67 ± 0,27</td> <td>25,85 ± 0,33</td> <td>1,05</td> <td>1,28</td> </tr> <tr> <td>240</td> <td>+</td> <td>28,66 ± 0,36</td> <td>28,71 ± 0,56</td> <td>1,26</td> <td>1,95</td> </tr> <tr> <td>échantillon (20 spores Mmd)^a</td> <td>+</td> <td>24,59 ± 0,15</td> <td>24,79 ± 0,15</td> <td>0,61</td> <td>0,61</td> </tr> </tbody> </table> <p>^a Echantillon préparé en laboratoire contenant 20 urédiniospores de <i>Mmd</i> en mélange avec 2 mg d'urédiniospores de <i>Mlp</i></p> <p>La répétabilité qualitative et la reproductibilité qualitative sont toutes les deux à 100%. La répétabilité quantitative et la reproductibilité quantitative sont supérieures à 98%.</p>	Cible	concentration de la cible (cp/μL)	résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)		CV (%)		intra-test	inter-test	intra-test	inter-test	Mmd	240 10 ²	+	22,34 ± 0,14	22,34 ± 0,21	0,63	0,94	240 10 ¹	+	25,67 ± 0,27	25,85 ± 0,33	1,05	1,28	240	+	28,66 ± 0,36	28,71 ± 0,56	1,26	1,95	échantillon (20 spores Mmd) ^a	+	24,59 ± 0,15	24,79 ± 0,15	0,61	0,61		
Cible	concentration de la cible (cp/μL)				résultat qualitatif	Moyenne des Ct (±SD)		CV (%)																															
		intra-test	inter-test	intra-test		inter-test																																	
Mmd	240 10 ²	+	22,34 ± 0,14	22,34 ± 0,21	0,63	0,94																																	
	240 10 ¹	+	25,67 ± 0,27	25,85 ± 0,33	1,05	1,28																																	
	240	+	28,66 ± 0,36	28,71 ± 0,56	1,26	1,95																																	
	échantillon (20 spores Mmd) ^a	+	24,59 ± 0,15	24,79 ± 0,15	0,61	0,61																																	



Caractéristique de performance	Résultats obtenus																													
Robustesse	Le tableau ci-dessous présente les résultats de robustesse obtenus (variation du volume réactionnel, du volume d'ADN matrice, et de la température d'hybridation).																													
	Table 4. Robustesse du test de PCR en temps réel (d'après Boutigny et al., 2013a)																													
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Paramètre</th> <th colspan="3">Résultat qualitatif (moyenne des Ct \pmSD)^a</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">volume réactionnel</td> <td>18 μL</td> <td>20 μL</td> <td>22 μL</td> </tr> <tr> <td>positif (29,47 \pm 0,52 a)</td> <td>positif (29,4 \pm 0,29 a)</td> <td>positif (29,86 \pm 0,81 a)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">volume de l'ADN matrice</td> <td>1,8 μL</td> <td>2 μL</td> <td>2,2 μL</td> </tr> <tr> <td>positif (29,76 \pm 0,37 a)</td> <td>positif (29,77 \pm 0,75 a)</td> <td>positif (29,57 \pm 0,38 a)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">température d'hybridation</td> <td>60°C</td> <td>62°C</td> <td>64°C</td> </tr> <tr> <td>cible positif (28,95 \pm 0,44 a)</td> <td>positif (28,65 \pm 0,29 a,b)</td> <td>positif (29,20 \pm 0,46 b)</td> </tr> <tr> <td>non cible</td> <td>négatif (>40)</td> <td>nd</td> <td>nd</td> </tr> </tbody> </table>	Paramètre	Résultat qualitatif (moyenne des Ct \pm SD) ^a			volume réactionnel	18 μL	20 μL	22 μL	positif (29,47 \pm 0,52 a)	positif (29,4 \pm 0,29 a)	positif (29,86 \pm 0,81 a)	volume de l'ADN matrice	1,8 μL	2 μL	2,2 μL	positif (29,76 \pm 0,37 a)	positif (29,77 \pm 0,75 a)	positif (29,57 \pm 0,38 a)	température d'hybridation	60°C	62°C	64°C	cible positif (28,95 \pm 0,44 a)	positif (28,65 \pm 0,29 a,b)	positif (29,20 \pm 0,46 b)	non cible	négatif (>40)	nd	nd
	Paramètre	Résultat qualitatif (moyenne des Ct \pm SD) ^a																												
	volume réactionnel	18 μL	20 μL	22 μL																										
positif (29,47 \pm 0,52 a)		positif (29,4 \pm 0,29 a)	positif (29,86 \pm 0,81 a)																											
volume de l'ADN matrice	1,8 μL	2 μL	2,2 μL																											
	positif (29,76 \pm 0,37 a)	positif (29,77 \pm 0,75 a)	positif (29,57 \pm 0,38 a)																											
température d'hybridation	60°C	62°C	64°C																											
	cible positif (28,95 \pm 0,44 a)	positif (28,65 \pm 0,29 a,b)	positif (29,20 \pm 0,46 b)																											
non cible	négatif (>40)	nd	nd																											
^a Les nombres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Fisher nd : non déterminé																														
Le test développé est robuste pour les paramètres listés dans le tableau. De plus, des conditions de stringence réduites par la baisse de la température d'hybridation/synthèse à 60°C n'affectent pas la spécificité du test.																														
Sensibilité relative																														
Spécificité relative	La comparaison de la nouvelle méthode qPCR avec la méthode MF/04/18 a été effectuée selon les critères de la norme ISO 16140 en utilisant des échantillons artificiellement contaminés, de statut sanitaire connu.																													
Exactitude relative	Les données sont disponibles dans le dossier LNR de validation de la méthode MOA031.																													
Autres critères <i>Sensibilité pratique</i>	Le seuil pratique de détection a été estimé à une urediniospore de <i>Mmd</i> dans un mélange de 2 mg d'urediniospores d'autres espèces de <i>Melampsora</i> .																													
Autres critères : <i>Durée d'analyse</i>	Durée estimée de la nouvelle méthode : 1 journée																													



Annexe 1 : Schéma décisionnel





Bibliographie

- [1] Anonymous, 2000. Council Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. O.J.L **169**, 10.7.2000:1.
- [2] Boutigny AL, Guinet C, Vialle A, Hamelin R, Andrieux A, Frey P, Husson C, loos R, 2013a. Optimization of a real-time PCR assay for the detection of the quarantine pathogen *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*. *Fungal Biology* 117(6): 389-398.
- [3] Boutigny AL, Guinet C, Vialle A, Hamelin R, Frey P, loos R. 2013b. A sensitive real-time PCR assay for the detection of the two *Melampsora medusae formae speciales* on infected poplar leaves. *European Journal of Plant Pathology* 136(3): 433-441.
- [4] EPPO, 2009. PM 7/93 (1): *Melampsora medusae*. *EPPO Bulletin* **39**: 328-336.
- [5] Frey P, Gérard P, Feau N, Husson C, Pinon J, 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. In: Rust diseases of Willow and Poplar. Ed. by Pei M. H.; McCracken A. R. Wallingford: CAB International, pp. 63-72.
- [6] Shain L, 1988. Evidence for formae speciales in the poplar leaf rust fungus, *Melampsora medusae*. *Mycologia* **80**: 729-732.