

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA 054 - Version 2

Avril 2019

Identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par analyse morphobiométrique et biomoléculaire

Laboratoire de la Santé des Végétaux

Laboratoire national de référence « Nématodes phytoparasites sur toutes matrices »



Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
NS./01/05 version a		Juillet 2001	Version initiale
MOA019 partie B version 1a	majeure	Juillet 2012	Changement de format (NS→ MOA) - Le nombre minimal de kystes à analyser est précisé. - La technique d'extraction d'ADN ainsi que l'outil d'identification biomoléculaire ont été optimisés Autres améliorations : - La technique d'identification morphobiométrique est largement détaillée. - Les critères pris en compte pour la formulation du résultat final après identification morphobiométrique et biomoléculaire sont présentés.
MA054 V2*	mineure	Avril 2019	Mise au format ANSES avec modification du code identifiant Modification de l'introduction §1 précision concernant le domaine d'application avec remplacement du terme « susceptibles d'appartenir au genre <i>Globodera</i> » par « type <i>Globodera</i> » pour tenir compte du terme utilisé dans la MA019 §4 légères modifications du logigramme (titres, chapitres...) §8.2.3.1 précision en cas d'absence de larves viables §8.3 et §9.1 intégration de <i>G. tabacum</i> dans les résultats §10 ajout des caractéristiques de performance de la méthode. Bibliographie : complétée par 3 nouvelles publications

*La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 11 février au 11 mars 2019 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Nématologie

Laboratoire National de Référence : Nématodes phytoparasites sur toutes matrices

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte

BP 35327

35653 Le Rheu Cedex

France

Tél : +33(0)2 99 30 90 35

Contact : rennes.lsv@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
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 Tampon d'extraction d'ADN.....	9
5.2 Oligonucléotides.....	9
5.3 ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase	9
5.4 Autres réactifs	9
6. Appareillage et matériels	10
6.1 Identification morphobiométrique.....	10
6.1.1 Matériel.....	10
6.1.2 Consommables et petits matériels	10
6.2 Identification par amplification génomique	11
7. Échantillons	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	11
8. Mode opératoire	12
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	12
8.2 Identification morphobiométrique.....	12
8.2.1 Principe.....	12
8.2.2 Prise d'analyse.....	12
8.2.3 Mode opératoire détaillé.....	12
8.2.3.1 Examen externe à faible grossissement	12
8.2.3.2 Examen microscopique à fort grossissement.....	14
8.2.3.3 Formulation du résultat de l'analyse morphobiométrique	16



8.3 Identification par amplification génomique	18
8.3.1 Prise d'analyse pour amplification génomique.....	18
8.3.2 Contrôles et témoins	18
8.3.3 Extraction d'ADN.....	19
8.3.4 Amplification d'ADN	20
8.3.5 Tests PCR spécifiques ITS5-R3-P4 et ITS5-T4	20
8.3.6 Test PCR universelle	21
8.3.7 Electrophorèse.....	22
8.3.8 Révélation.....	22
8.3.9 Résultats.....	23
8.3.9.1 Contrôle de la validité des résultats.....	23
8.3.9.2 Calculs et expression des résultats	23
9. Résultats finaux	25
9.1 Utilisation des résultats élémentaires (résultat final par kyste analysé).....	25
9.2 Formulation du résultat final pour un échantillon.....	26
10. Caractéristiques de performance de la méthode.....	27
10.1 Évaluation de la partie identification morphobiométrique de la méthode.....	27
10.2 Évaluation de la partie identification biomoléculaire de la méthode.....	28
Bibliographie.....	29



Introduction

Les nématodes à kystes du genre *Globodera* sont des parasites obligatoires présentant une grande spécificité d'hôte. La plupart des espèces sont inféodées aux Solanacées, alors que d'autres se développent sur Astéracées et Rosacées.

Originaires des Andes, les espèces *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* ont été introduites en Europe au cours du XIXe siècle. La pomme de terre est la principale plante hôte de ces nématodes, mais on recense également la tomate et l'aubergine. Ces nématodes peuvent provoquer d'importantes diminutions de rendement ainsi que des pertes d'ordre qualitatif en cas de fortes attaques. Dans ce cas, les symptômes de « piqûres » visibles sur tubercules peuvent rendre la production non commercialisable.

Étant donné les dégâts occasionnés par ces nématodes, ils sont réglementés par une majorité de pays dans le monde (EPPO 2017) l'application de cette méthode s'inscrit dans le cadre de la surveillance pour lutter contre la propagation de ces ravageurs en Europe conformément à la directive européenne 2007/33/CE du Conseil du 11 juin 2007.

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.



1. Objet et domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'identification de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* par analyse morphobiométrique et biomoléculaire.

Les échantillons sont constitués par des lots de un ou plusieurs kystes susceptibles d'appartenir au « type *Globodera* ».

2. Documents de référence

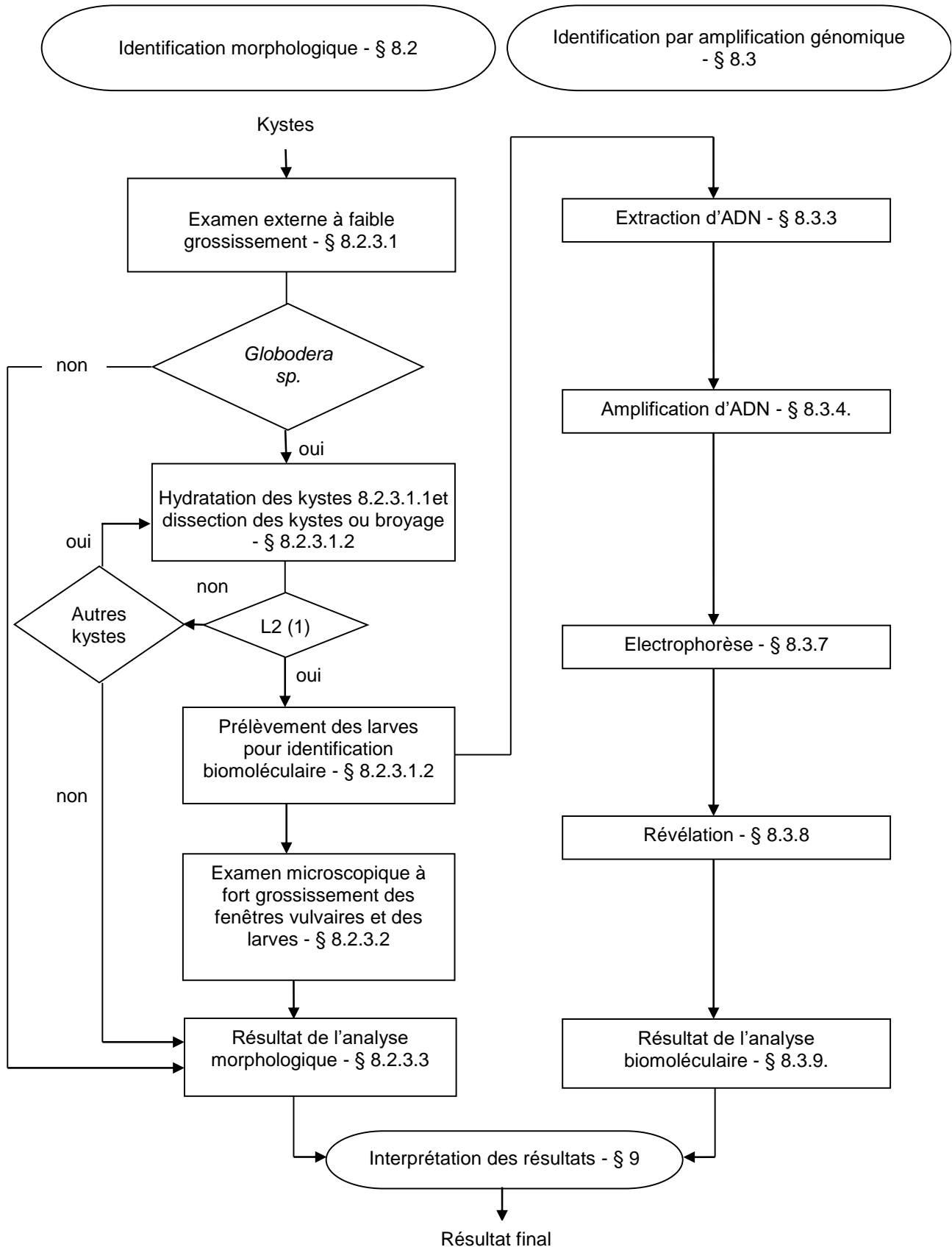
- [1] MOA 012 - Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites.
- [2] MA 019 - Détection des nématodes du genre *Globodera*
- [3] Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 - Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000.
- [4] Rapport d'évaluation de la méthode d'identification morphologique de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* Lsv-Unité de Nématologie février 2015
- [5] MOA-REP 001 : Répertoire des recettes en vigueur au LNPV
- [6] Compte-rendu d'essai méthodologique « Evaluation comparative de différents outils moléculaires pour l'identification de *G. pallida* et *G. rostochiensis* ». LSV-Unité de Nématologie (2010).

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...).



4. Principe de la méthode





5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Tampon d'extraction d'ADN

Tris HCl 10mM pH=8,0 ; EDTA 1mM ; Nonidet P40 1% ; protéinase K 100µg/mL tampon final (d'après Ibrahim *et al.*, 1994).

5.2 Oligonucléotides

Nématodes cibles	Amorces	Séquence 5' → 3'
G. pallida et G. rostochiensis D'après BULMAN S.R. & MARSHALL J.W. (1997) et SKANTAR <i>et al.</i> (2007)	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
	PITSr3*	AGC GCA GAC ATG CCG CAA
	PITSp4*	ACA ACA GCA ATC GTC GAG
	PITSt4*	ACA GCA GCA ATC GTC GGC
Tous nématodes D'après THIERY M. & MUGNIERY D. (1996)	18S	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT
	26S	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG

* Par soucis de clarté, ces amorces seront nommées respectivement R3, P4 et T4 dans la suite du document

5.3 ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase

N'importe quelle polymérase à ADN peut être utilisée dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la Taq MP Biomedicals (ref. EPTQD925) lors de l'évaluation de la méthode. Dans ce cas, le tampon de polymérase utilisé sera celui commercialisé avec la polymérase à ADN associée.

Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un pré-mix commercial.

5.4 Autres réactifs

- Eau (eau ultra pure de qualité biologie moléculaire et eau du robinet)
- Chlorure de magnésium (MgCl₂)
- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)
- Tampon de charge
- Marqueur de taille moléculaire
- Agarose qualité biologie moléculaire
- Tampon d'électrophorèse : Tris Acétate EDTA (TAE) ou Tris Borate EDTA (TBE)
- Marqueur d'acides nucléiques : bromure d'éthidium, SYBRSafe ou autres intercalants de l'ADN

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl₂, etc.) peuvent être utilisés.



6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

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

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur)
	congélateur : $\leq -10^\circ\text{C}$ ou $\leq -18^\circ\text{C}$ en fonction des recommandations fournisseur
	thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$

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

6.1 Identification morphobiométrique

6.1.1 Matériel

- Microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) avec éclairage épiscopique et diascopique, grossissement de l'ordre de 16 à 60X.
- Microscope photonique haute définition (grossissements de l'ordre de X16 à X1000).

6.1.2 Consommables et petits matériels

- Barreau de verre,
- Cellule de lecture
- Cil monté sur aiguille ou autre instrument adapté pour la manipulation des nématodes filiformes,
- Huile d'immersion,
- Iridotome, scalpel ou aiguille,
- Lames porte-objet et lamelles couvre-objet,
- Microtubes,
- Pinceau,
- Pissette d'eau courante,
- Platine chauffante,
- Potter,
- Syracuse ou équivalent,
- Tampon d'extraction ADN (§ 5.1.),
- Vernis, lut.



6.2 Identification par amplification génomique

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse ...), le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent
- Appareil de PCR conventionnelle.

7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons reçus par le laboratoire sont constitués par des lots de un ou plusieurs kystes de type *Globodera*. Si les kystes sont issus d'une analyse de détection selon la méthode MA 019, les échantillons sont constitués par la totalité des kystes détectés comme étant de type *Globodera*.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les lots de kystes à analyser sont conditionnés dans des microtubes identifiés conservés au frais et à sec.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les lots de kystes analysés sont conditionnés dans des microtubes identifiés conservés au frais et à sec.



8. Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Pas de préparation particulière.

8.2 Identification morphobiométrique

8.2.1 Principe

L'analyse repose sur l'examen morphobiométrique de la zone périnéale des kystes et du stylet des larves qu'ils renferment. Lorsque des larves viables sont détectées, une identification biomoléculaire est réalisée conjointement.

Remarque :

L'analyse permet d'identifier l'espèce *Globodera rostochiensis* et le groupe d'espèces *Globodera pallida-tabacum*, elle ne permet pas de différencier *G. pallida* de *G. tabacum*.

8.2.2 Prise d'analyse

L'analyse porte sur un minimum de 3 kystes par échantillon chaque fois que cela est possible. La totalité des kystes est analysée lorsque l'échantillon est constitué par 1, 2 ou 3 kystes.

8.2.3 Mode opératoire détaillé

8.2.3.1 Examen externe à faible grossissement

Vérifier l'appartenance des kystes au genre *Globodera* (examen au stéréo microscope) :

- kystes sphériques ou presque sphériques, sans protubérance postérieure (Figures 1D et 2),
- fenêtre vulvaire circulaire (zone vulvaire circumfenestrée) (Figure 3C),
- fenêtre anale non visible (zone anale afenestrée) (Figure 3C),

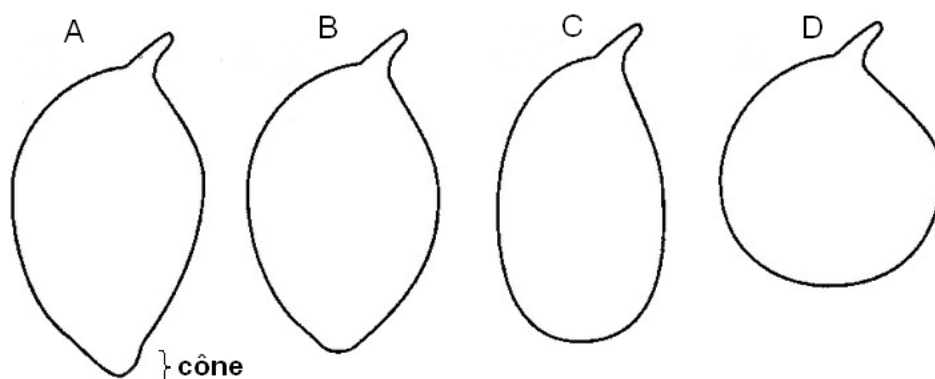


Figure 1 – Formes de kystes de nématodes (d'après Wouts W.M. et Baldwin J.G., 1998)

A- Citriforme avec cône proéminent (*Heterodera*) ; B- Citriforme avec cône peu proéminent (*Heterodera* ou *Cactodera*) ; C- Ovoïde, sans cône (*Punctodera*) ; D- Sphérique, sans cône (*Globodera*).

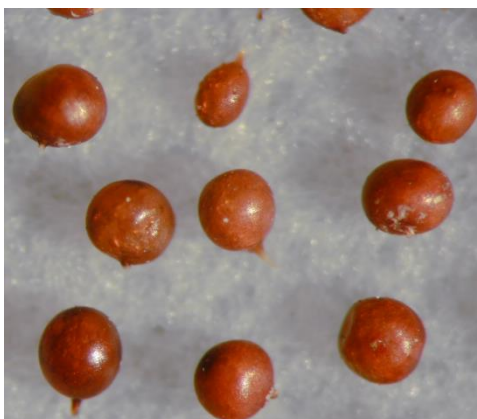


Figure 2 – Kystes de *Globodera* sp. (ANSES-LSV, Rennes, France)

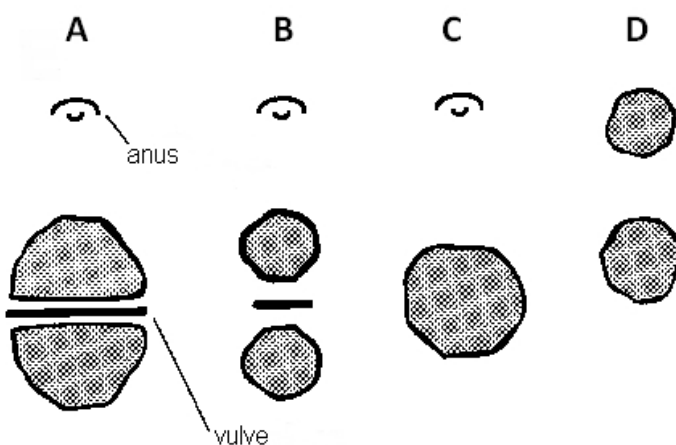


Figure 3 – Zones périnéales de kystes (d'après Wouts W.M. et Baldwin J.G., 1998)

A- Zone vulvaire ambifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*) ; B- Fenêtre vulvaire bifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*) ; C- Fenêtre vulvaire circulaire et fenêtre anale non visible (*Globodera* et *Cactodera*) ; D- Fenêtres vulvaires et anales circulaires (*Punctodera*).

8.2.3.1.1 Hydratation des kystes

Faire tremper les kystes de *Globodera* sp. dans de l'eau, durant au moins 6 heures, pour hydrater les larves et ainsi faciliter l'observation.

8.2.3.1.2 Dissection des kystes, prélèvement de larves pour analyse biomoléculaire, montage des préparations microscopiques

Choisir au moins 3 kystes en bon état contenant apparemment des larves, lorsque cela est possible. En opérant successivement sur chacun des kystes choisis, sectionner la partie postérieure du kyste et confirmer l'identification du genre (Figures 1 et 3).



- Si le kyste contient des larves viables:

1- Prélever 2 à 3 larves (à l'aide d'un cil) pour l'identification biomoléculaire, les déposer dans un microtube de tampon d'extraction d'ADN (environ 100 µL de tampon par tube). Une brève centrifugation est réalisée afin de disposer les larves au fond du tube, dans le tampon d'extraction. Les microtubes peuvent être conservés au froid négatif dans l'attente de l'analyse.

Si les kystes préparés contiennent seulement 1 à 3 larves, elles sont toutes prélevées pour l'analyse biomoléculaire.

2- Pour l'identification morphobiométrique, préparer un fragment incluant la fenêtre vulvaire et l'anus (à l'aide d'un iridotome, scalpel, ou d'une aiguille). La zone périnéale ainsi que quelques larves viables (si présentes) sont préparées pour un examen au microscope : dépôt dans une goutte d'eau sur lame porte-objet puis sertissage de la lamelle couvre-objet (lut ou vernis à ongle).

Dans l'éventualité d'une analyse complémentaire (§ 8.3) et jusqu'à la fin de l'analyse, sont conservés au frais :

- les reliquats (larves) de chaque kyste examiné, dans un syracuse, avec un peu d'eau,
- les kystes non analysés,
- les montages de zones périnéales, après observation.

- Si le kyste ne contient pas de larves viables :

Son identification est interrompue (pas de montage de la zone périnéale).

Cas particulier : si aucun des kystes préparés ne contient de larves viables, les autres kystes de l'échantillon sont broyés dans de l'eau (avec un barreau de verre ou au Potter si le nombre de kystes est important). Le broyat est ensuite vidé dans une cellule de lecture.

- si des larves viables sont présentes, en conditionner 2 ou 3 dans un microtube de tampon d'extraction d'ADN pour analyse biomoléculaire.
- si absence de larves viables, l'analyse est terminée. Le résultat de l'analyse est indiqué ainsi : *Globodera pallida* non détecté et *Globodera rostochiensis* non détecté.

8.2.3.2 Examen microscopique à fort grossissement

Tuer les larves à la chaleur si cela est nécessaire (platine chauffante).

Déposer une goutte d'huile d'immersion sur les préparations et les observer à fort grossissement :

- confirmation de l'appartenance du kyste au genre *Globodera* (anus non entouré par des plis cuticulaires en anneaux),
- examen de la zone périnéale: détermination du rapport de Granek (distance de la fenêtre vulvaire à la fenêtre anale / diamètre de la fenêtre vulvaire) et dénombrement des plis cuticulaires entre fenêtre vulvaire et anus (Figures 4, 6 et 7). Après observation, la lame est conservée jusqu'à la fin de l'analyse. Elle pourra être utilisée en cas de besoin d'analyses complémentaires.
- examen de 3 larves lorsque cela est possible : longueur du stylet et forme des boutons basaux (Figure 5 et 8).

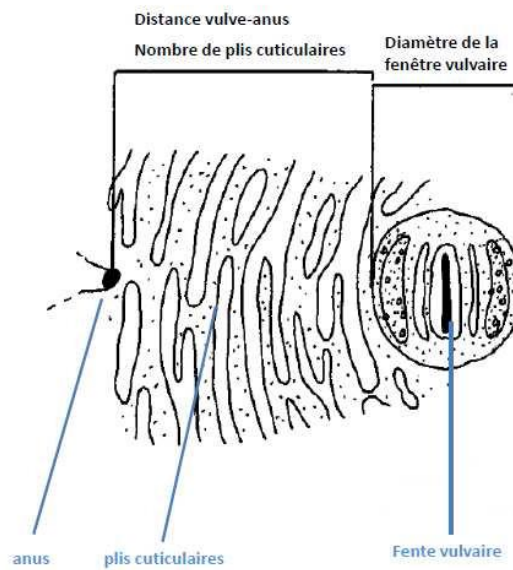


Figure 4 – Zone périnéale d'un kyste du genre *Globodera* et critères utilisés pour l'identification morphobiométrique (adapté de Fleming C.C. et Powers T.O., 1998)

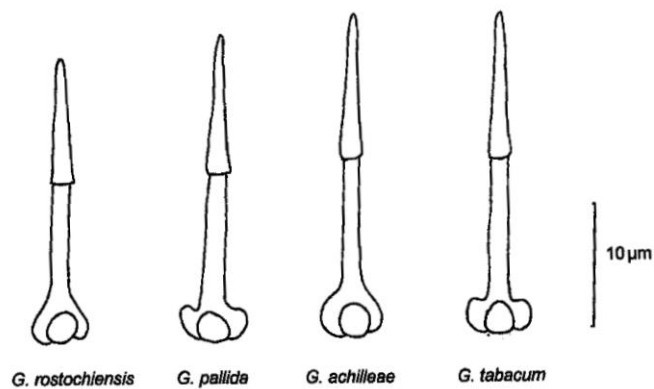


Figure 5 – Stylets de 4 espèces de *Globodera* sp. (d'après Fleming C.C. et Powers T.O., 1998)



Figure 6 – Fenêtre vulvaire de *Globodera pallida* (ANSES-LSV, Rennes, France)

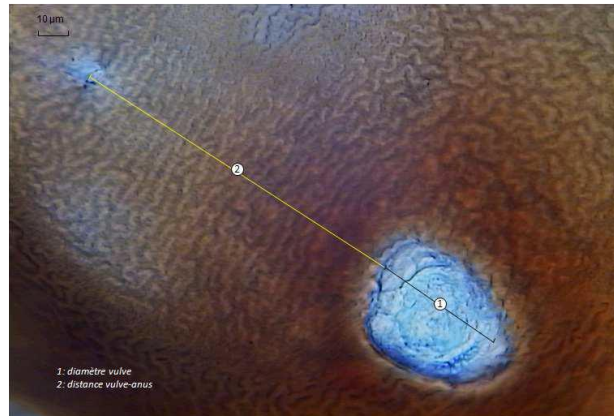


Figure 7 – Fenêtre vulvaire de *Globodera rostochiensis* (ANSES-LSV, Rennes, France)

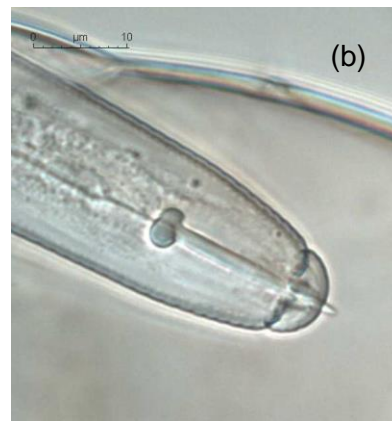


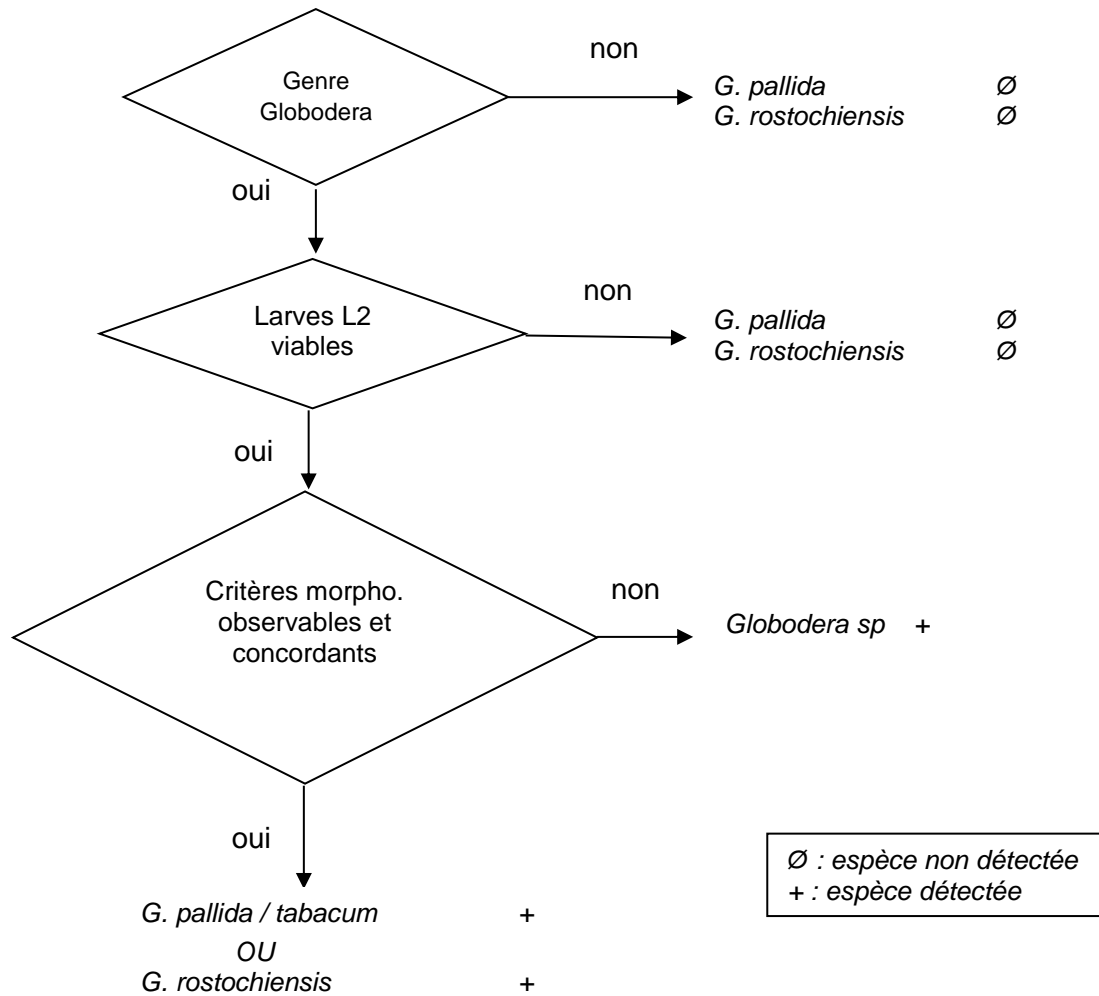
Figure 8 – Stylet de larves de 2ème stade de *Globodera rostochiensis* (a) et *Globodera pallida*(b) (ANSES-LSV, Rennes, France)

8.2.3.3 Formulation du résultat de l'analyse morphobiométrique

Déterminer l'espèce de chacun des kystes observés en suivant le logigramme ci-dessous et en appliquant les règles de décision présentées dans le tableau suivant.



1 – Logigramme pour l'identification morphobiométrique d'un kyste de *Globodera*





2 - Critères utilisés pour l'identification morphobiométrique d'un kyste du genre *Globodera*

	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i> / <i>tabacum</i>
Nombre de plis (N)	N > ou = 20	N < ou = 14
Rapport de Granek (G) (1)	G > ou = 3,5	G < ou = 2,3
Longueur du stylet des L2 (L)	L < ou = 22 µm	L > ou = 23 µm
Bouton basaux du stylet des L2 (B)	Petits boutons peu proéminents, non pointés antérieurement	Gros boutons proéminents, pointés antérieurement

(1) : G = distance de la fenêtre vulvaire à la fenêtre anale / diamètre de la fenêtre vulvaire.

L'espèce *G. rostochiensis* ou le groupe d'espèces *G. pallida* / *tabacum* sont identifiés comme tels lorsque les 3 conditions suivantes sont remplies pour un kyste considéré :

- les 4 critères N, G, L, et B ont pu être observés,
- les critères L et B des larves correspondent à la même espèce ou au même groupe d'espèces,
- les critères N et G du kyste ne correspondent pas à l'autre espèce ou groupe d'espèces.

Le résultat de l'analyse est alors l'espèce (*G. rostochiensis*) ou le groupe d'espèces (*G. pallida* / *tabacum*) indiqué par les critères L et B.

Si l'une des 3 conditions ci-dessus n'est pas remplie, le résultat est *Globodera* sp..

Si absence de larves viables le résultat de l'analyse est alors *Globodera pallida* non détecté et *Globodera rostochiensis* non détecté.

8.3 Identification par amplification génomique

8.3.1 Prise d'analyse pour amplification génomique

L'analyse est réalisée sur des larves isolées qui auront été prélevées et conditionnées préalablement (§ 8.2.3.1.2) : 2 à 3 individus conditionnés en microtube avec environ 100 µL de tampon d'extraction ADN. La prise d'analyse est alors soit soumise à extraction d'ADN, soit conservée en froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN. Si l'analyse porte sur une seule larve, des réserves sont émises si un résultat négatif est obtenu.

8.3.2 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse, sont au minimum les suivants :

- un contrôle négatif de processus (E-) : tampon d'extraction ADN seul conditionné selon les mêmes modalités que celles pour l'échantillon à analyser,
- un témoin positif de PCR (A+)* : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de la cible ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et a permis une amplification des échantillons contenant la cible.



- un témoin négatif de PCR (A-) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR,
- un témoin négatif de spécificité (S-)* : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN non cible ; cela permet de vérifier l'absence de réaction croisée au cours de la réaction de PCR. Ce type de témoin n'est pas nécessaire pour le test universel 18S-26S.
- Selon les tests PCR, les extraits d'ADN à inclure seront issus des espèces suivantes :

	Test ITS5-R3-P4	Test ITS5-T4	Test 18S-26S
Témoin positif de PCR (A+)	<i>G. pallida</i> et <i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i> et <i>G. tabacum</i>	Une espèce de <i>Globodera</i> (par exemple, <i>G. pallida</i> ou <i>G. rostochiensis</i>)
Témoin négatif de spécificité (S-)	<i>G. tabacum</i>	<i>G. pallida</i>	

Ces contrôles permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (amplification de l'ADN de *G. pallida* et/ou *G. rostochiensis* pour le contrôle positif et absence de contamination pour les contrôles négatifs).

N.B. : Les présents termes sont définis dans le glossaire MOA-GLO 001.

Les témoins notés * peuvent être fournis par l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux.

8.3.3 Extraction d'ADN

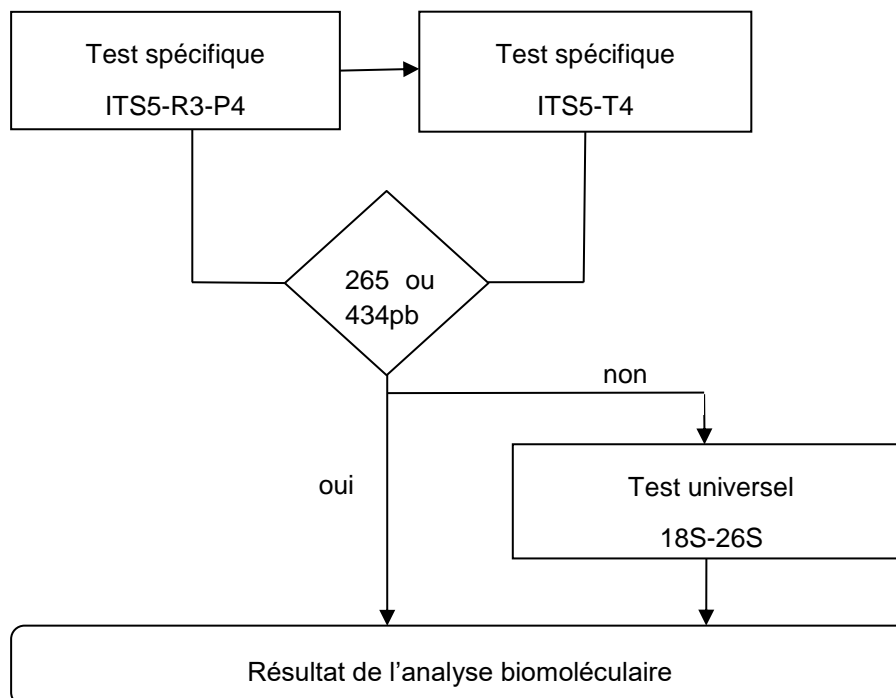
L'extraction d'ADN résulte de l'action successive d'un broyage mécanique (billes de verre) et d'un traitement chimique (protéinase K).

Pour ce faire,

- Ajouter des billes de verre de diamètres différents (1 bille de 3 mm et quelques billes de 1 mm) au microtube contenant les nématodes.
- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à fréquence maximale, les microtubes ayant préalablement été décongelés).
- Placer les microtubes au bain marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour optimiser l'activité de la protéinase K.
- Centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires.
- Procéder à un nouveau traitement thermique des microtubes à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K).
-



8.3.4 Amplification d'ADN



8.3.5 Tests PCR spécifiques ITS5-R3-P4 et ITS5-T4

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

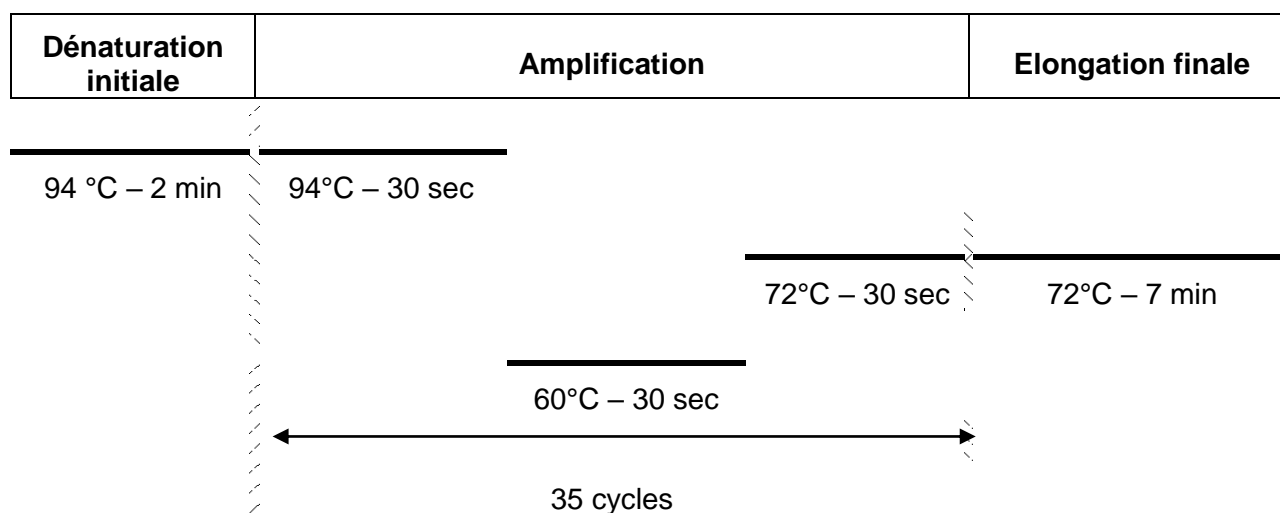
Réactifs	Tests spécifiques	
	Test ITS5-R3-P4	Test ITS5-T4
	Concentration finale par tube de réaction	
Volume réactionnel total	20 µL	20µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X	1 X
MgCl ₂ (prendre en compte le MgCl ₂ éventuellement présent dans le tampon Taq)	2 mM	1,5 mM
Amorces	ITS5 : 0,64 µM R3 : 0,64 µM P4 : 0,64 µM	ITS5 : 0,64 µM T4 : 0,64 µM
dNTPs	0,25 mM	0,16 mM
Taq DNA polymérase	0,6U/réaction	0,6U/réaction
Eau ultra pure	Qsp 25 µL	Qsp 25 µL

Ajouter 5 µL d'ADN à 20µL de mélange réactionnel



L'évaluation de ce test PCR a été réalisée avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals et son tampon associé (réf. EPTQD925).

Appliquer le cycle d'amplification suivant :



8.3.6 Test PCR universelle

Ce test est réalisé lorsque le test spécifique ITS5-R3-P4 ne génère aucune amplification (voir logigramme décisionnel présenté dans le point 8.3.9.2).

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

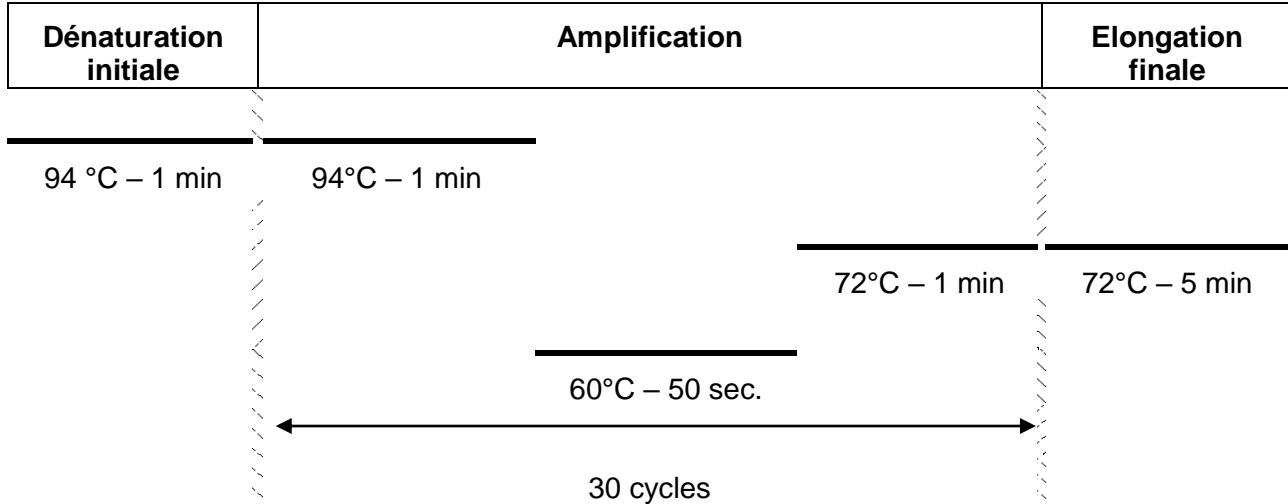
Test 18S-26S	
Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	20 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl ₂ (prendre en compte le MgCl ₂ éventuellement présent dans le tampon Taq)	2 mM
Amorce 18S	0.5 µM
Amorce 26S	0.5 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	0,5U/réaction
Eau ultra pure	Qsp 20 µL

Ajouter	5µL d'ADN	à	20µL de mélange réactionnel
---------	-----------	---	-----------------------------

L'évaluation de ce test PCR a été réalisée avec une Taq DNA polymérase de MP Biomedicals et son tampon associé (réf. EPTQD925).



Appliquer le cycle d'amplification suivant :



8.3.7 Electrophorèse

Préparer un gel d'agarose à 2% environ dans un tampon TAE ou TBE (voir MOA-REP 001). Le marqueur d'ADN (intercalant) peut soit être ajouté dans le gel lors de sa préparation, soit ultérieurement.

Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôts afin de définir la taille du fragment obtenu.

Faire migrer les produits d'amplification en appliquant un courant électrique.

8.3.8 Révélation

La révélation se fait directement par lecture sur table UV si le marqueur d'ADN a été préalablement incorporé.

Sinon, la révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (par exemple, le bromure d'éthidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/ml). Cette solution doit être protégée de la lumière ; après coloration, rincer si nécessaire le gel à l'eau (sans chlore).

Observer le gel sous UV.

Remarque 1 : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau), le BET ou tout autre marqueur d'ADN. Tous les déchets ayant été en contact avec du BET ou tout marqueur d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

Remarque 2 : L'observation de gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une copie /image fidèle du gel sur un support stable dans le temps et référencé est nécessaire.



8.3.9 Résultats

8.3.9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'analyse est validée si les conditions ci-après sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus (E-)	NEGATIF
Contrôle négatif de PCR (A-)	NEGATIF
Contrôle(s) positif(s) de PCR (A+)	POSITIF(S)
Contrôle négatif de spécificité (S-)	NEGATIF

8.3.9.2 Calculs et expression des résultats

L'analyse est qualitative. Quel que soit le test PCR, le résultat d'un puits est :

- - : négatif lorsqu'aucune amplification à la taille attendue n'est observée,
- + : positif lorsqu'un fragment de taille attendue est observé.

Les tailles de fragments attendues sont les suivantes :

	Test ITS5-R3-P4	Test ITS5-T4	Test 18S-26S
<i>G. pallida</i>	~265 pb	pas d'amplification	~1200pb
<i>G. rostochiensis</i>	~434 pb	~265 pb	~1200pb
<i>G. tabacum</i>	pas d'amplification	~265 pb	~1200pb

Le résultat d'un test PCR est obtenu en suivant les indications mentionnées dans les tableaux suivants :

Cas des PCR spécifiques ITS5-R3-P4 et ITS5-T4 :

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 ^{ème} amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NEGATIF, test PCR universelle à réaliser

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

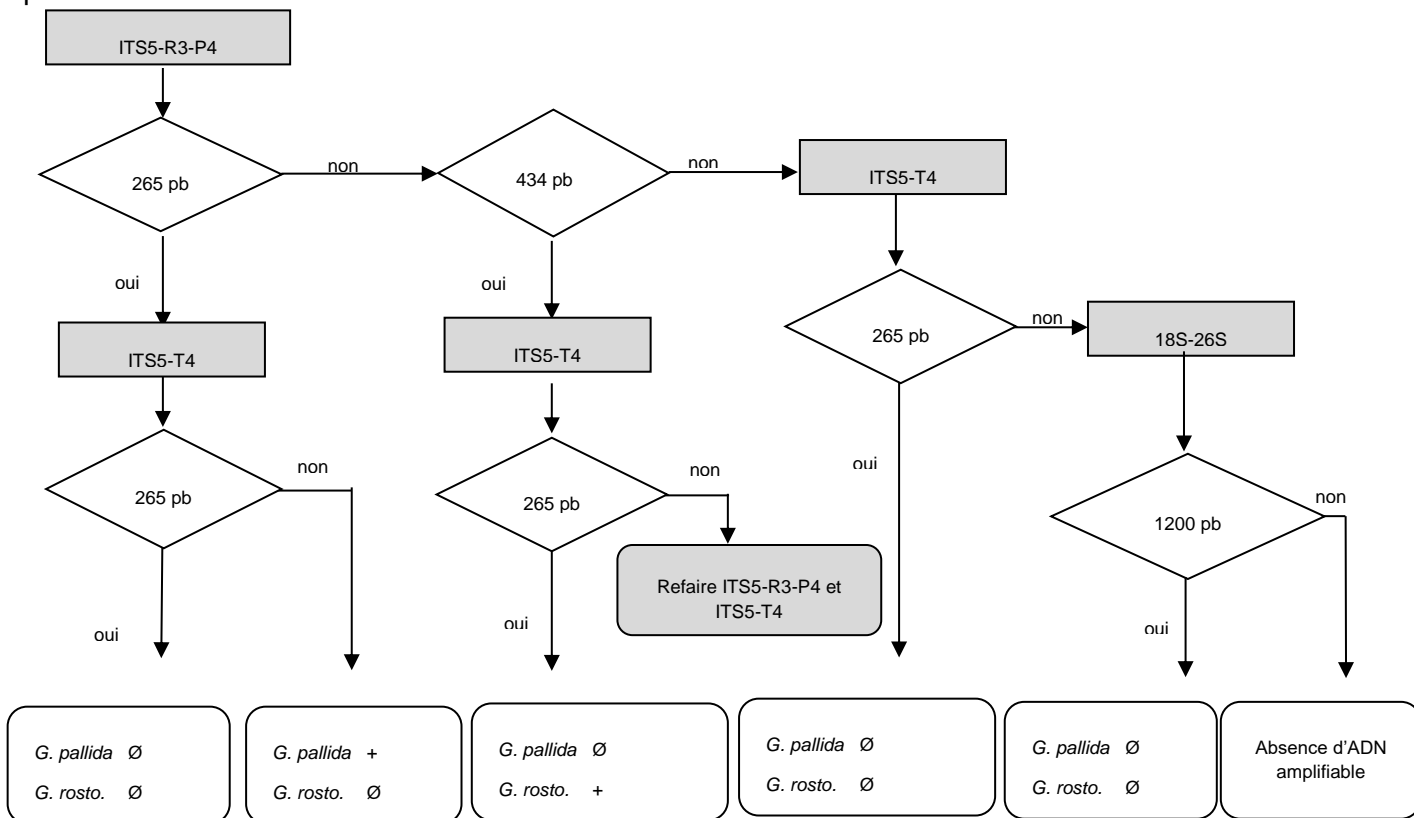


Cas de la PCR universelle 18S-26S :

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	POSITIF
-	-	NEGATIF

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

L'interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire est réalisée en suivant le logigramme ci-après :





9. Résultats finaux

9.1 Utilisation des résultats élémentaires (résultat final par kyste analysé)

Le résultat final, **pour un kyste analysé**, est issu de la combinaison des résultats de l'identification morphobiométrique et de l'identification biomoléculaire de ce kyste, en appliquant les règles de décisions suivantes:

		Identification morphobiométrique (1)		
		<i>Globodera sp.</i> +	<i>G. pallida/tabacum</i> +	<i>G. rostochiensis</i> +
Identification moléculaire	ADN non amplifiable	/ (2)	/ (2)	<i>G. rostochiensis</i> +
	<i>G. pallida</i> +	<i>G. pallida</i> +	<i>G. pallida</i> +	/ (2)
	<i>G. rostochiensis</i> +	<i>G. rostochiensis</i> +	/ (2)	<i>G. rostochiensis</i> +
	<i>G. tabacum</i> +	<i>G. pallida</i> ND <i>G. rostochiensis</i> ND (3)	<i>G. pallida</i> ND <i>G. rostochiensis</i> ND (3)	/ (2)
	<i>G. pallida</i> ND <i>G. rostochiensis</i> ND	<i>G. pallida</i> ND <i>G. rostochiensis</i> ND	/ (2)	/ (2)

+ : détecté ; ND : non détecté

(1) : Si présence de kyste de *Globodera sp.* sans un contenu larvaire viable, le résultat final est *G. pallida* non détecté et *G. rostochiensis* non détecté. Il n'y a pas d'identification biomoléculaire.

(2) : L'analyse ne permet pas de délivrer de résultat. De nouvelles analyses morphobiométriques et biomoléculaires sont engagées. En fonction des reliquats existants, on procède comme suit et par ordre de priorité

- en présence de reliquats de larves du kyste considéré, de nouvelles larves sont montées et mesurées. De plus, de nouvelles mesures morphobiométriques de la zone périnéale du kyste sont réalisées à partir de la lame de montage conservée, afin de confirmer les précédentes mesures; une identification biomoléculaire est réalisée.

- en l'absence de reliquats de larves du kyste considéré, mais en présence de reliquats de kystes de l'échantillon, des identifications (morphobiométriques et biomoléculaires) sont engagées sur au moins 3 nouveaux kystes (si possible) ;

- en l'absence de reliquat ou en cas de la persistance de la non concordance, le client est informé et un rapport d'analyse est édité avec pour résultats « *Globodera sp.* détecté ».

(3) : résultat « *Globodera tabacum* détecté » à mettre en commentaire sur le rapport



9.2 Formulation du résultat final pour un échantillon

En cumulant le résultat final obtenu pour chacun des kystes analysés dans l'échantillon, le résultat porté sur le rapport d'analyse sera, selon le cas :

- *Globodera pallida* non détecté et *Globodera rostochiensis* non détecté
- *Globodera pallida* détecté (4)
- *Globodera pallida* détecté et *Globodera rostochiensis* non détecté (5)
- *Globodera rostochiensis* détecté (4)
- *Globodera rostochiensis* détecté et *Globodera pallida* non détecté (5)
- *Globodera pallida* détecté et *Globodera rostochiensis* détecté
- *Globodera* sp. détecté (6)

(4) lorsque seule une fraction des kystes de l'échantillon est analysée, il sera alors indiqué sur le rapport d'analyse que « l'analyse ne permet pas de fournir de résultat pour l'autre espèce demandée ».

(5) ces résultats ne peuvent être indiqués que si tous les kystes de l'échantillon sont analysés ou bien préciser en commentaire sur le rapport d'analyse l'espèce identifiée et le nombre de kystes analysés.

(6) résultat indiqué lorsqu'aucune analyse complémentaire n'a pu être réalisée suite à une non concordance des résultats entre l'identification biomoléculaire et morphobiométrique (absence de reliquat) ou en cas de persistance de la non concordance.

Remarque :

Lorsqu'aucun des kystes n'a pu être analysé par biologie moléculaire (absence de larves viables), le résultat "*Globodera pallida* non détecté et *Globodera rostochiensis* non détecté" est complété par un commentaire : "détection de kystes de *Globodera* sp. sans contenu larvaire viable".



10. Caractéristiques de performance de la méthode

10.1 Évaluation de la partie identification morphobiométrique de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée ci-après est extraite du rapport « Évaluation de la méthode d'identification morphologique de *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* » (§ 5) établi par le LNR en Février 2015.

L'identification morphobiométrique ne permet pas de différencier *Globodera pallida* de *G. tabacum*, l'évaluation concerne donc le groupe *Globodera* « *pallida* / *tabacum* » et *G. rostochiensis*.

La méthode est évaluée séparément pour chacun des deux nématodes recherchés *Globodera* « *pallida* / *tabacum* » puis *G. rostochiensis*

Les critères d'évaluation testés sont :

- **Spécificité diagnostique**: aptitude de la méthode à ne pas détecter la cible à partir d'un éventail de populations non cibles (absence de faux positifs).
- **Sensibilité diagnostique**: aptitude de la méthode à détecter la cible à partir d'un éventail de populations cibles (absence de faux négatifs).
- **Répétabilité**: aptitude de la méthode à reproduire des résultats identiques dans des conditions identiques à partir d'un set constitué d'une préparation cible parmi plusieurs préparations non cibles.
- **Robustesse** : (Reproductibilité intra laboratoire): aptitude de la méthode à reproduire des résultats identiques dans des conditions différentes (matériel, opérateurs, etc.).

Remarque : Le **seuil de détection** n'est pas évalué étant donné que l'identification est réalisée au niveau le plus bas, l'individu (1 kyste).

Un échantillon correspond à 3 kystes d'une population pure de *Globodera* d'espèce connue (population issue d'élevage). Ce nombre de 3 kystes a été défini par la méthode, comme nécessaire pour réaliser l'analyse dans les conditions optimales.

Pour réaliser cette évaluation il a été utilisé 7 populations de *Globodera pallida*, 10 de *G. rostochiensis*, 3 de *G. tabacum*.

Critères de performance	<i>Globodera</i> « <i>pallida</i> / <i>tabacum</i> »	<i>Globodera rostochiensis</i>
Spécificité diagnostique	100 %	100 %
Sensibilité diagnostique	76,7 %	66.7 %
Répétabilité	100 %	66,7 %/
Robustesse « matériels »	100 %	83 %
Robustesse « opérateurs »	92 %	67 %
Interprétation des résultats	difficile	difficile

Les identifications morphobiométriques aboutissant à *Globodera sp.* sont considérées comme des faux positifs dans le cas de la spécificité diagnostique, de faux négatifs dans le cas de la sensibilité diagnostique et comme un désaccord entre paire si présence d'un *Globodera sp.* dans la paire dans le cas de la répétabilité et de la robustesse.



Si à l'inverse les résultats *Globodera sp.* ne sont pas considérés comme tels, l'ensemble des critères de performance passent à 100%.

Bien que l'évaluation de cette méthode dans le premier cas de figure montre une bonne spécificité, les résultats de sensibilité, de répétabilité et de robustesse « opérateurs », notamment pour *Globodera rostochiensis* démontre l'importance d'un personnel bien formé et confirme la nécessité de coupler l'identification morphobiométrique avec des tests biomoléculaires.

D'autre part comme cela a été mis en évidence lors des tests de répétabilité il est nécessaire que les observations des larves montées soient réalisées aussitôt après le montage étant donné que leur altération rapide peut affecter la qualité des mesures.

Les tests biomoléculaires (3 larves de chacun des kystes observés) ont été systématiquement réalisés à la suite des identifications morphologiques, comme cela est prévu par la méthode; ils ont toujours été conformes aux résultats attendus.

10.2 Évaluation de la partie identification biomoléculaire de la méthode

Les données de validation sont extraites du compte-rendu d'essai méthodologique « Évaluation comparatives de différents outils moléculaires pour l'identification de *G. pallida* et *G. rostochiensis* » rédigés en juillet 2010.

« Le test décrit par Bulman et al. (1997) permet d'identifier G. pallida et G. rostochiensis de façon spécifique (seule la population B2 de G. rostochiensis n'est pas détectée et la population GV2 de G. tabacum donne une amplification correspondant à G. pallida). La sensibilité du test est correcte puisque l'on obtient un pourcentage de détection de 100% pour 1 larve de G. rostochiensis et de 96% pour 1 larve de G. pallida.

La combinaison des tests utilisant les amorces décrites par Bulman et al. (1997) et le couple ITS5-T4 décrit par Skantar et al. (2007) permet d'identifier les espèces G. pallida, G. rostochiensis et G. tabacum. De plus, ces tests ont montré une sensibilité correcte avec un pourcentage de détection d'une larve atteignant 100% pour G. rostochiensis et 96 % pour G. pallida avec les amorces ITS5-R3-P4 et 100% pour G. rostochiensis et 96 % pour G. tabacum pour les amorces ITS5-T4.

Par ailleurs, la PCR universelle utilisant les amorces 18S-26S permet de détecter les individus du genre Globodera et permet également de montrer la présence d'ADN amplifiable dans le cas de résultat négatif avec les tests PCR spécifiques. »



Bibliographie

BULMAN S.R. & MARSHALL J.W. (1997), Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25, 123-129.

FLEMING C.C. & POWERS T.O. (1998), Potato cyst nematode diagnostics: morphology, differential hosts and biochemical techniques. In: Marks R.J. and Brodie B.B. (Ed.), *Potato Cyst Nematodes: biology, distribution and control*. CAB International, Wallingford, pp.91-114.

IBRAHIM S.K., PERRY R.N., BURROWS P.R., HOOPER D.J. (1994). Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus augustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of nematology*, 26, 412-421.

OEPP (2009), Diagnostic *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*, PM7/40(2). *Bulletin OEPP*, 39, 354-368.

SKANTAR A.M., HANDOO Z.A., CARTA L.K., CHITWOOD D.J. (2007), Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with Potato in Idaho. *Journal of Nematology*, 39(2), 133-144.

THIERY M. & MUGNIERY D. (1996), Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants, *Fundamental and applied Nematology*, 19(5), 471-479.

WOUTS W.M. & BALDWIN J.G. (1998), Taxonomy and identification. In: Sharma S.B. (Ed.), *The Cyst Nematodes*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 83-122.