

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA057- Version 2

Mai 2018

Détection de *Bursaphelenchus xylophilus* par PCR temps réel dans un groupe d'insectes vecteurs

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
v1			Version initiale (initialement codifiée sous MOA020 partie C)
v2*	Majeure	Mai 2018	Mise au format ANSES et changement de code identifiant Evolution de l'extraction d'ADN : broyage dans 5 mL de PBS et modification du format du kit commercial (QIAamp DNA maxi remplacé par QIAamp DNA mini), en respectant les protocoles fournisseurs. Cette modification permet d'augmenter le nombre maximal d'insectes à analyser et améliorer la limite de détection (modification du cycle seuil).

*La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 12/04/2018 au 22/04/2018 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

Contact : rennes.lsv@anses.fr



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. Principe de la méthode	8
4. Réactifs	8
4.1 Eau.....	8
4.2 Kit d'extraction d'ADN.....	8
4.3 Oligonucléotides	9
4.4 Pré-mix commercial.....	9
4.5 Contrôles.....	9
4.6 Consommables divers	10
5. Appareillage et matériels	10
6. Échantillons	11
6.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
6.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
6.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	11
7. Mode opératoire	12
7.1 Préparation des échantillons pour analyse	12
7.2 Broyage des échantillons.....	12
7.3 Etape de lyse.....	12
7.4 Extraction des acides nucléiques.....	13
7.5 Détection par PCR temps réel	13
8. Résultats	14
8.1 Contrôle de la validité des résultats	15
8.2 Expression des résultats.....	16
9. Caractéristiques de performance de la méthode	17
Bibliographie	18



Introduction

Le nématode du pin *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970 est l'agent responsable du dépérissement des pins. Il se rencontre principalement sur *Pinus*, mais d'autres conifères tels que *Larix*, *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Pseudotsuga* et *Picea* peuvent aussi être hôtes de ce nématode.

Les nématodes sont transmis d'une plante-hôte à une autre par un coléoptère du genre *Monochamus*.

Le transport de bois infesté et/ou du vecteur contaminé constitue le mode de dissémination du parasite au niveau international.

Le nématode visé est un organisme nuisible de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29 CE).



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 décrit les modalités de détection du nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus*, dans son insecte vecteur, un coléoptère du genre *Monochamus*. Elle repose sur une détection directe du nématode dans les insectes en réalisant une extraction d'ADN globale puis une analyse utilisant la technique de PCR en temps réel.

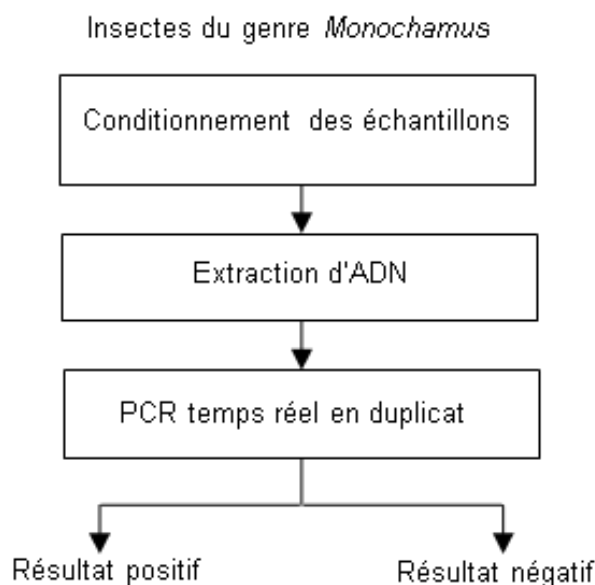
2. Documents de référence

- [1] 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 p. 0001 – 0022
- [2] GLO 001 - Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
- [3] REP001 - Répertoire des recettes MOA REP001 version 1b
- [4] Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* sur extrait de bois. Septembre 2014
- [5] Rapport d'évaluation d'outils moléculaires de détection de *Bursaphelenchus xylophilus* dans des insectes vecteurs. Octobre 2014
- [6] Compte rendu d'essai méthodologique n°18/03



3. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est représenté dans le schéma ci-dessous :



4. 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.

4.1 Eau

- Eau du robinet
- Eau ultra pure de qualité biologie moléculaire

4.2 Kit d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons (insectes avec ou sans nématodes) est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN disponible dans le commerce : kit QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®) complété par le tampon AL et la protéase (Qiagen®). Tout autre kit ou protocole d'extraction d'ADN peut être utilisé dès lors qu'il donne des résultats au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit d'extraction d'ADN préconisé (5 nématodes de *B. xylophilus* doivent être détectés dans un pool de 20 insectes vecteurs avec une valeur de Ct < 28).



4.3 Oligonucléotides

Cible	Amorces et sondes	Séquence 5' → 3'
<i>B. xylophilus</i> François <i>et al.</i> (2007)	BSatF	TGACGGAGTGAATTGACAAGACA
	BSatRV	AAGCTGAAACTTGCCATGCTAAA
	BSatS	FAM-ACACCATTTCGAAAGCTAATCGCCTGAGA-BHQ1
Contrôle interne (18s) Ioos <i>et al.</i> (2009)	18S uni-F	GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA
	18S uni-R	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P	JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1

4.4 Pré-mix commercial

Des mélanges réactionnels prêts à l'emploi commercialisés par plusieurs fournisseurs et contenant les réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR en temps réel (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl₂, etc.) peuvent être utilisés dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec le kit utilisé lors de l'évaluation de la méthode (au minimum, vérifier la sensibilité et la spécificité).

Le protocole a été évalué en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics.

4.5 Contrôles

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 témoin positif de processus (E+)¹ : extrait de *Monochamus* broyés dans du tampon PBS et contaminé artificiellement avec quelques individus de *B. xylophilus* (niveau proche du seuil de détection de la méthode, environ 5 nématodes cibles), traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.
- un témoin négatif de processus (E-) : extrait de *Monochamus* broyés dans du tampon PBS, non contaminé par *B. xylophilus*, traité dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser ; ce contrôle peut éventuellement contenir des nématodes autres que *B. xylophilus*.
- un témoin positif de PCR (A+)¹ : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de *B. xylophilus* ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et permet une amplification des échantillons contaminés.

¹ Ce type de témoin peut être fourni par l'unité de Nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux



- 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.

Ces témoins permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (extraction et amplification de l'ADN de *B. xylophilus* pour le contrôle positif et l'absence de contamination pour le contrôle négatif).

4.6 Consommables divers

- Tubes 50 mL de type Falcon
- Scalpel
- Billes d'acier de diamètre environ 1 cm
- Tampon PBS 1X (NaCl, Na₂HPO₄ 12H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O, eau) (cf. MOA REP001 version 1b).

5. 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 = ± 10%
Température	réfrigérateur : 5°C et EMT = ± 4°C (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur)
	congélateur : ≤ -10°C ou ≤ -18°C en fonction des recommandations fournisseur
	thermocycleur* : EMT justesse = ± 1°C ; EMT homogénéité = ± 2°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.



En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, bain-marie, ...), le matériel suivant est nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Agitateur à retournement
- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage avec un logiciel permettant l'acquisition de fluorescence et l'évaluation automatique des cycles seuil.

6. Échantillons

6.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les insectes analysés doivent être morts avant ouverture du contenant (insecticide dans le piège et congélation si nécessaire).

Le volume de l'échantillon n'est pas limitant, tous les insectes sont analysés par fraction de 20 insectes maximum.

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.

6.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les échantillons sont conservés au réfrigérateur avant le conditionnement des insectes pour analyse.

Après conditionnement par fraction de 20 insectes maximum, les tubes sont stockés au congélateur.

6.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Il n'y a pas d'exigence particulière concernant la conservation des reliquats d'échantillon pour lesquels le résultat d'analyse est « test négatif ».

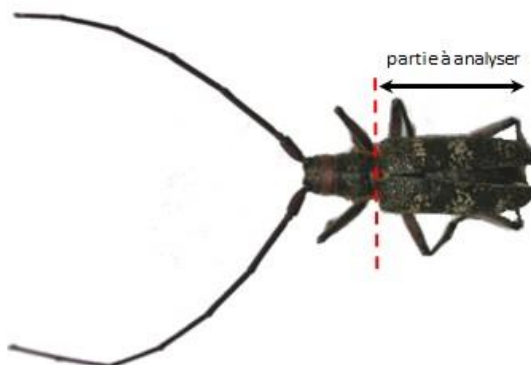
Cas d'un échantillon dont le résultat est « test positif » ou ininterprétable : les extraits lysés sont conservés 2 mois au frais.



7. Mode opératoire

7.1 Préparation des échantillons pour analyse

1. La partie postérieure des insectes est prélevée à l'aide d'un scalpel à usage unique comme schématisé ci-après.



2. Conditionner les parties postérieures prélevées dans un ou plusieurs tubes de 50 mL de type Falcon à raison de 20 insectes maximum par tube.
3. Identifier les tubes à l'aide d'un marqueur indélébile (résistant au froid et à l'eau).

Remarque : il est possible de suspendre l'analyse à ce stade en congelant (<-10°C) les tubes contenant les parties d'insectes à analyser.

7.2 Broyage des échantillons

1. Si besoin, décongeler le contenu des tubes ayant été stockés au froid négatif.
2. Ajouter dans chacun des tubes :
 - 1 bille d'acier d'un diamètre d'environ 1 cm
 - 5 mL environ de tampon PBS 1X
3. Disposer les portoirs contenant les tubes de 50 mL dans un agitateur rotatif (par exemple : agitateur mélangeur Reax, HEIDOLPH) et mettre en agitation à faible vitesse (vitesse 30 à 40 tours/min environ) pendant environ une heure.
4. Réaliser une brève centrifugation avant ouverture des tubes.

7.3 Etape de lyse

1. Ajouter 500 µL de protéase préalablement reconstituée,
2. Ajouter 12 mL de tampon AL,
3. Vortexer pour homogénéiser,
4. Incuber les extraits environ 10 min à 70°C dans un bain thermostaté préalablement chauffé,
5. Au terme des 10 minutes d'incubation, reprendre les tubes du bain thermostaté et procéder à une brève centrifugation,
6. Ajouter 10 mL d'éthanol 96-99%,
7. Bien homogénéiser l'extrait lysé (vortex) et laisser reposer quelques minutes



7.4 Extraction des acides nucléiques

1. Transférer 700 µL de l'extrait lysé sur la colonne préalablement identifiée,
2. Centrifuger 1 min à 6000g,
3. Changer le collecteur,
4. Ajouter 500 µL de tampon AW1,
5. Centrifuger 1 min à 6000g,
6. Ajouter 500 µL de tampon AW2,
7. Centrifuger 3 min à 20000g,
8. Placer la colonne sur un tube 1,5 mL propre et identifié,
9. Ajouter 100 µL de tampon AE,
10. Incuber quelques minutes à température ambiante puis centrifuger 1 minute à 6000g,
11. Jeter la colonne et conserver l'éluât,
12. Une partie des solutions ADN est transférée en plaque PCR pour la suite de la manipulation.

Les solutions ADN éluées ($= S_{ADN}$) sont analysées directement par PCR temps réel, ou bien sont congelées ($< -10^{\circ}\text{C}$) jusqu'à leur analyse.

7.5 Détection par PCR temps réel

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le pré-mix LightCycler® 480 Probes Master de la société Roche Diagnostics. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais s'agissant d'un réactif critique, le laboratoire doit démontrer que l'utilisation du nouveau consommable conduit aux mêmes résultats. Dans le cadre d'analyses officielles, le laboratoire doit apporter au LNR la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode.

1. Préparation du mélange réactionnel :

Chaque extrait d'ADN est analysé **en duplicat**.

La composition du mélange réactionnel est décrite dans le tableau suivant :



Réactifs	Concentration finale (volume final par puits : 20 μ L)
Eau Ultra Pure	qsp 15 μ L
Tampon de polymérase à ADN ou tampon de pré-mix commercial	1 X*
Chlorure de magnésium	5,5 mM*
Amorce BSatF	0,3 μ M
Amorce BSatR	0,3 μ M
Sonde BSatS	0,1 μ M
Amorce 18S uni-F	0,3 μ M
Amorce 18S uni-S	0,3 μ M
Sonde 18S uni-P	0,1 μ M
dNTPs	200 μ M / dNTP*
Taq polymérase	0,025U/ μ L*

* ou concentration fixée et optimisée par le fournisseur si un pré-mix du commerce est utilisé.

2. Distribution du mélange réactionnel à raison de 15 μ L par puits PCR (plaques, microtubes ou autres consommables adaptés au thermocycleur).
3. Ajout de 5 μ L de solution d'ADN à tester dans les puits PCR.
4. Amplification

Le programme d'amplification du thermocycleur est le suivant :

Dénaturation initiale	10 min à 95°C	35 cycles
Dénaturation	15 sec à 95°C	
Hybridation - Elongation	1 min à 60°C*	

* acquisition de la fluorescence en fin d'élongation

8. Résultats

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel. Pour être prise en compte, la valeur de Ct doit correspondre à une courbe d'amplification de type exponentiel.



8.1 Contrôle de la validité des résultats

1. Validation de l'amplification

L'amplification est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :

- le témoin négatif de PCR (A-) ne donne pas d'amplification ou bien donne une valeur de Ct ≥ 28 ,
- le témoin positif de PCR (A+) donne une amplification avec une valeur de Ct < 28 .

2. Validation de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est validée pour l'organisme cible recherché (test spécifique) lorsque :

- le témoin négatif de processus (E-) ne génère pas d'amplification ou montre une amplification avec une valeur de Ct ≥ 28 ,
- le témoin positif de processus (E+) génère une amplification avec une valeur de Ct < 28 .

Dans le cas où les résultats d'un ou plusieurs témoins ne sont pas conformes à ceux attendus (définis ci-dessus), l'analyse n'est pas validée et selon la non-conformité observée, toute ou partie de l'analyse est à refaire.



8.2 Expression des résultats

Lorsque la série d'analyses est validée par l'obtention de résultats conformes pour les différents témoins, les résultats des échantillons à analyser peuvent être interprétés de la façon suivante pour l'organisme cible recherché (test spécifique utilisant les amorces Bsat) :

Prise d'essai		Résultat de la prise d'essai
Puits 1	Puits 2	
+	+	Positif
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la deuxième amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	Pour le test universel 18S uni et pour la prise d'essai considérée : 1/ si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 30 est observée, le résultat pour la prise d'essai considérée est négatif. 2/ si une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct > 30 est observée ou s'il n'est pas observé d'amplification, refaire la PCR avec la solution d'ADN dilué au 1/10 ^e . Si le résultat de la 2 ^{ème} PCR est identique à celui de la 1 ^{ère} PCR, le résultat n'est pas interprétable. Une nouvelle analyse sur le reliquat de l'échantillon (extrait lysé avant § 7.4) est alors engagée si possible. Si non ou si le résultat n'est pas interprétable, le client est informé qu'aucun résultat ne pourra être fourni.

Tableau n°1 : Interprétation des résultats

- + : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de Ct < 28 pour le test spécifique *B. xylophilus*.
- : absence de courbe d'amplification exponentielle pour le test spécifique *B. xylophilus* ou valeur de Ct ≥ 28.

Quand plusieurs fractions de 20 insectes sont analysées pour un même échantillon, si une des fractions obtient un résultat positif, l'échantillon est positif pour la détection de *B. xylophilus*.

Le résultat final de l'analyse est exprimé sous forme qualitative de la façon suivante :

« **Détection de *B. xylophilus* par PCR temps réel** » :

- « **Test négatif** » lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif pour l'organisme cible,
- « **Test positif** » lorsque le résultat de la prise d'essai est positif pour l'organisme cible.



9. Caractéristiques de performance de la méthode

Les caractéristiques de performance de la méthode d'analyse de détection de *B. xylophilus* dans un groupe de 20 insectes vecteurs sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	Performance de la méthode évaluée	
Sensibilité - inclusivité	100%	
Spécificité - exclusivité	100%	
Exactitude	100%	
Seuil de détection	5 individus au stade J2 (20 <i>Monochamus</i> +...) 2 individus au stade J2 5 individus au stade J2	
Répétabilité (selon le niveau de contamination)	92%	100%
Reproductibilité (selon le niveau de contamination)	87,5%	100%

Tableau n°2 : Synthèse de l'évaluation

La méthode évaluée permet de détecter la présence de *B. xylophilus* dans 100% des échantillons contenant au moins 5 nématodes dans un pool de 20 insectes.



Bibliographie

FRANCOIS C., CASTAGNONE C., BOONHAM N., TOMLINSON J., LAWSON R., HOCKLAND S., QUILL J., VIEIRA P., MOTA M., CASTAGNONE-SERENO P. (2007) Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular plant pathology* 8(6), 803-809.

IOOS R., FOURRIER C., IANCU G, GORDON TR. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* 99, 582-590.