

**Méthode d'analyse en santé des végétaux**

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA003- Version 3**

Février 2017

# Détection de *Fusarium circinatum* sur semences 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 versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1a		Mars 2010	Version initiale
V2a	majeures	Mai 2014	<ul style="list-style-type: none"><li>• Passage de l'analyse en <i>triplicata</i> à l'analyse en <i>duplicata</i> des extraits d'ADN</li><li>• Suppression du test de confirmation par PCR conventionnelle jugé insuffisamment spécifique</li></ul>
V3 *	mineures	Février 2017	<ul style="list-style-type: none"><li>• Changement de format de présentation de la méthode</li><li>• Mise à jour des règles de décision et de leur présentation</li><li>• Mise à jour de la dénomination scientifique de l'organisme cible (<i>Fusarium circinatum</i>) selon les nouvelles règles nomenclaturales en mycologie</li><li>• Changement du seuil de positivité d'un réplicat de PCR pour la cible</li></ul>

\* La version 3 a fait l'objet d'une consultation du public du 08 décembre 2016 au 08 janvier 2017 sur le site internet de l'agence.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie**

Laboratoire National de Référence Champignons phytopathogènes sur toute matrice

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : [nancy.lsv@anses.fr](mailto:nancy.lsv@anses.fr)

La présente méthode a été initialement mise au point, optimisée et évaluée par la station de mycologie du LNPV, en se basant sur les résultats d'un projet de recherche mené par le Laboratoire National de la Protection des Végétaux (station de mycologie, Nancy) visant à mettre au point une technique moléculaire de détection du champignon *Fusarium circinatum* (loos et al. 2009). Ce travail a bénéficié de la collaboration de T. Gordon (University of California, Davis).

La méthode a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



## Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction .....	5
Avertissements et précautions de sécurité .....	6
1     Objet et domaine d'application .....	7
2     Documents de référence.....	8
3     Termes, sigles et définitions .....	8
4     Principe de la méthode .....	9
5     Réactifs .....	10
5.1    Eau .....	10
5.2    Milieu liquide Potato Dextrose Broth (PD Broth).....	10
5.3    Kits d'extraction d'ADN.....	10
5.4    Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).....	10
5.5    Oligonucléotides .....	10
5.6    Kit de PCR en temps-réel.....	11
5.7    Autres consommables à usage unique.....	11
5.8    Contrôles et témoins .....	11
6     Appareillage et matériels .....	13
7     Échantillons.....	14
7.1    Conditions d'acceptation des échantillons .....	14
7.2    Conservation des échantillons avant analyse.....	14
7.3    Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	14
8     Mode opératoire .....	15
8.1    Préparation des échantillons pour analyse .....	15
8.2    Enrichissement biologique et broyage des prises d'essai .....	15
8.3    Extraction de l'ADN total.....	15
8.4    Test de détection par PCR en temps réel.....	16
9     Résultats .....	18
9.1    Contrôle de la validité des résultats .....	18
9.2    Calculs et expression des résultats .....	18
10    Caractéristiques de performance de la méthode .....	19
Annexe 1 : poids de mille grains.....	20
Annexe 2 : schéma décisionnel .....	21
Bibliographie.....	23



## Introduction

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (ex *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le parasite de régions infectées vers des régions saines.



## **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.**

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

### **Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :**

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

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

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



## 1 Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *F. circinatum* dans un lot de graines par le biais d'un test de détection par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps-réel qui cible des régions spécifiques du génome de cette espèce.

Ces méthodes sont qualitatives, elles permettent de détecter *F. circinatum* dans la limite du seuil de détection de la technique employée sans objectif de quantification.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *F. circinatum* ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la technique utilisée.

La fréquence d'infection des semences par *F. circinatum* peut être relativement faible et les semences infectées ne présentent pas de symptôme. La méthode utilisée permet de traiter un grand nombre de graines simultanément par enrichissement biologique suivi par une amplification par polymérisation en chaîne en temps réel (real-time PCR). L'utilisation d'amorces et d'une sonde marquée, dont la combinaison est spécifique de *F. circinatum*, permet de détecter et d'amplifier des portions discriminantes de l'ADN génomique de ce champignon. La détection s'effectue dans un extrait d'ADN total obtenu à partir de prises d'essai de graines broyées dans un milieu d'enrichissement.

De nombreuses espèces de *Fusarium* phylogénétiquement proches (y compris non formellement décrites) de *F. circinatum* peuvent être présentes dans les mêmes matrices. Afin de sécuriser la spécificité de détection de *F. circinatum*, le séquençage du produit positif de PCR par le LNR peut permettre de confirmer avec certitude l'identité de ce dernier.

Cette technique permet de détecter l'organisme cible quel que soit son état physiologique.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode concerne uniquement les semences de *Pinus* spp. et *Pseudotsuga menziesii*.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été mise au point et validée sur des semences de *Pinus* spp et *Pseudotsuga menziesii* sans enrobage phytosanitaire. L'effet d'un éventuel enrobage sanitaire sur la qualité de l'analyse utilisant cette méthode est inconnu.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : La taille de l'échantillon de graines reçu au laboratoire pour recherche de *F. circinatum* doit dans la mesure du possible permettre le prélèvement d'un échantillon pour analyse d'environ 1000 graines. Dans le cas où l'échantillon reçu au laboratoire ne permet pas le prélèvement d'environ 1000 graines (cas des essences à poids de mille grains très élevé comme le *Pinus pinea* par exemple), l'ensemble de l'échantillon reçu sera pesé (si poids non indiqué) et utilisé comme échantillon pour analyse. Le rapport d'essai mentionnera dans ce cas que l'analyse n'a pu être réalisée que sur X g de graines (< 1000 graines) et que le résultat de l'analyse doit être interprété en conséquence.



## 2 Documents de référence

- [1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

## 3 Termes, sigles et définitions

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

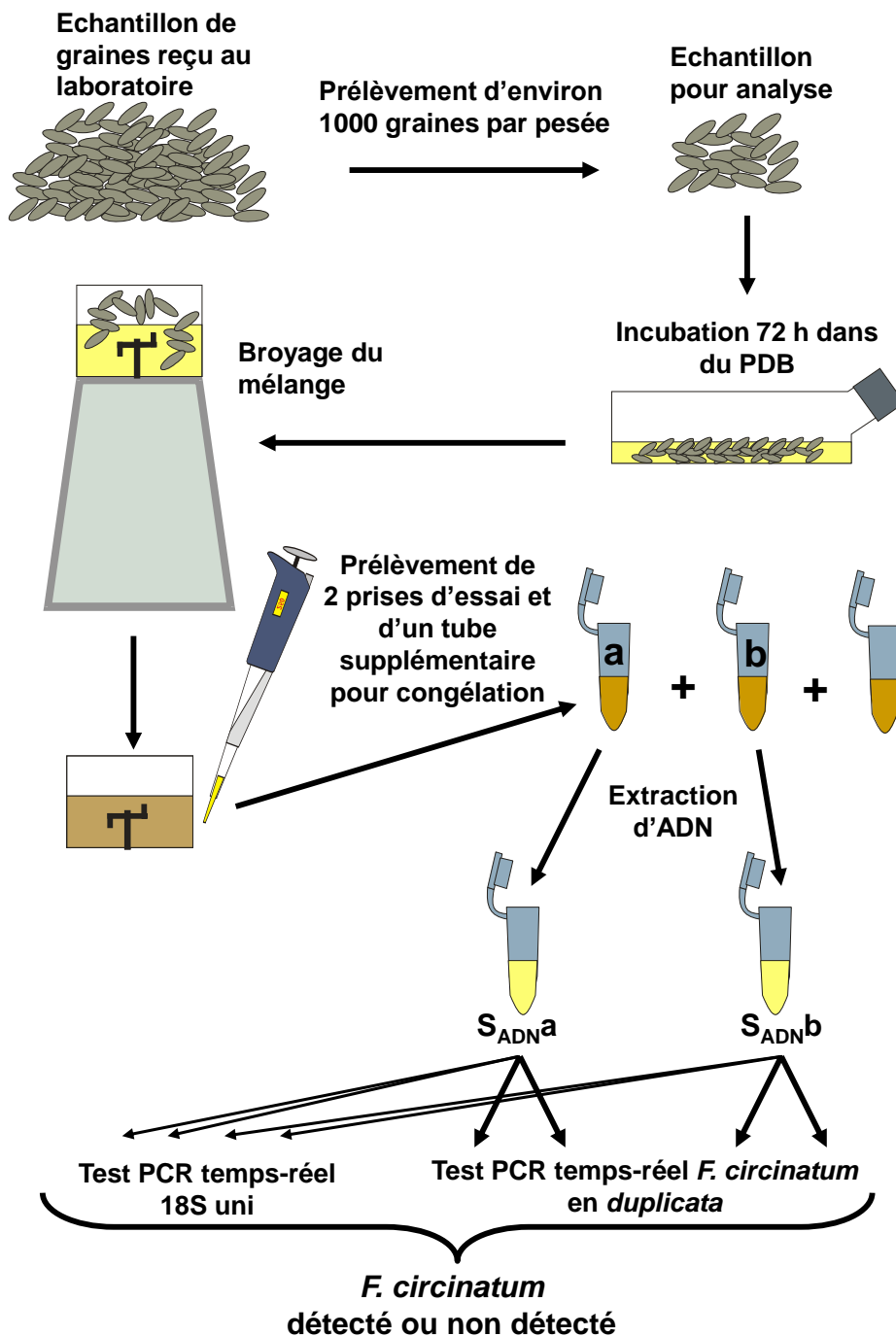
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.





#### 4 Principe de la méthode

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





## 5 Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influencer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

### 5.1 Eau

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

### 5.2 Milieu liquide Potato Dextrose Broth (PD Broth)

Le PD broth est reconstitué à partir d'une poudre prête à l'emploi (2% de dextrose et 0.4% d'amidon de pomme de terre en concentration finale) en suivant les recommandations du fournisseur, puis stérilisé par autoclavage.

### 5.3 Kits d'extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons analysés (à la fois ADN végétal, ADN fongique, et éventuellement bactérien, viral etc.) est extrait et purifié à l'aide d'un mini kit d'extraction d'ADN de plante disponible dans le commerce. Le kit initialement validé pour cette méthode est NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) (loos *et al.*, 2009, dossier LNR de validation de la méthode MOA003 partie B).

### 5.4 Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

Ce composé insoluble est uniquement disponible en poudre. Il permet de chélater certains composés inhibiteurs de PCR libérés lors de l'extraction d'ADN.

### 5.5 Oligonucléotides

Cible	Amorce sonde	ou Sequence (5'-3')
<i>F. circinatum</i>	FCIR-F <sup>a</sup>	TCGATGTGTCGTCTCTGGAC
	FCIR-R <sup>a</sup>	CGATCCTCAAATCGACCAAGA
	FCIR-P <sup>a</sup>	[FAM]-CGAGTCTGGCGGGACTTTGTGC-[BHQ1]
Plante/champignon	18S uni-F <sup>a</sup>	GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA
	18S uni-R <sup>a</sup>	CCACCACCCATAGAATCAAGA
	18S uni-P <sup>a</sup>	[JOE]-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-[BHQ1]

<sup>a</sup> (loos *et al.*, 2009)



Les fluorophores rapporteurs utilisés pour chaque sonde peuvent être modifiés, sous réserve que le fluorophore extincteur associé soit adapté.

### 5.6 Kit de PCR en temps-réel

Le kit initialement validé pour cette méthode est le qPCR core kit No ROX (Eurogentec) (loos *et al.*, 2009, dossier LNR de validation de la méthode MOA003).

### 5.7 Autres consommables à usage unique

- Flacons plats de culture cellulaire en plastique, stériles et à usage unique ou stérilisables de volume et surface adaptée aux types de graines analysées. Des sachets plastiques neufs et robustes de taille adaptée peuvent être toutefois utilisés pour l'incubation de graines de taille très importante (*ex. P. pinea*)
- Microcônes stériles à filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de 2 ml
- Microtubes ou capillaires stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur temps réel utilisé, à paroi fine, individuels, en barrette de 4, 8 ou en plaque de 96.

### 5.8 Contrôles et témoins

La technique de détection de régions cibles d'ADN d'un organisme par la technique de PCR en temps réel impose l'utilisation d'une série de contrôles et témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces contrôles et témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

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

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

- Un contrôle de la qualité de l'extraction d'ADN et de la présence d'inhibiteur sera réalisé pour chaque prise d'essai. Il prendra la forme d'un test PCR temps réel utilisant la combinaison d'amorces / sonde 18S uni -F/-R/-P. Ce test permet de générer un signal de fluorescence de nature exponentielle significativement supérieur au bruit de fond si de l'ADN de plante ou de champignon est présent dans un extrait, sans effet inhibiteur suffisant (loos *et al.*, 2009). Toutefois, les prises d'essai qui sont positives pour le test *F. circinatum* ne nécessiteront pas systématiquement de contrôle de la qualité d'ADN. Ce test sera réalisé dans une réaction distincte du test de détection de *F. circinatum*. En revanche, l'analyse des courbes de fluorescence 18S uni-F/-R/-P se limitera aux données acquises



lors des 30 premiers cycles exclusivement. Une  $S_{ADN}$  sera dite positive pour le test 18S uni si le Ct (Cycle threshold, cycle seuil) moyen généré est dans une gamme de Ct acceptable, préalablement déterminée expérimentalement par le laboratoire, sur ce type de matrice (semences de *Pinus*) dans ses propres conditions. *Dans les conditions de développement et de validation de ce test, la valeur maximale acceptable de Ct pour le test 18S uni a été déterminée à 15.4 (Dossier LNR de validation de la méthode MOA003 partie B).*

- Un témoin négatif de processus ( $T_{-PROC}$ ) ou un témoin négatif d'extraction ( $T_{-extr.}$ ) sera préparé pour toute série d'extractions. Ce dernier, constitué de PD Broth stérile, sera incubé en parallèle aux autres échantillons pour analyse et subira donc toutes les phases de l'analyse pour vérifier l'absence de contamination lors de la phase d'enrichissement et d'extraction d'ADN (1er type de faux positif). Le T-PROC sera lui aussi traité comme un échantillon pour analyse, c'est à dire broyé, suite à quoi une unique prise d'essai d'environ 500  $\mu$ l sera réalisée pour extraction d'ADN.
- Un témoin positif ( $T_{+18S Pinus}$ ) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel 18S uni. Il permet de vérifier que la réaction PCR 18S uni s'est effectuée de façon correcte. Ce  $T_{+18S Pinus}$  est constitué d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée une cible de test PCR 18S uni-F/-R/-P issue d'ADN de semences de *Pinus*, ou d'une solution d'ADN de semences de *Pinus* à une concentration similaire à ce qui est obtenu en moyenne à partir d'échantillons à analyser.
- Un témoin positif en limite pratique de détection ( $T_{+LOD}$ ) sera systématiquement testé en *duplicata* lors de chaque réaction de PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P. Il permet de vérifier que la réaction PCR s'est effectuée de façon optimale (conditions thermodynamiques, volumétriques, et chimiques) pour que la plus petite quantité détectable de *F. circinatum* 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 *F. circinatum* ou d'une solution calibrée de plasmides bactériens dans lesquels est clonée la cible du test PCR FCIR-F/-R/-P. Ce  $T_{+LOD}$  doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions. En pratique, le  $T_{+LOD}$  peut être défini comme la plus petite quantité de cible produisant un résultat positif dans 100 % des cas.
- 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 FCIR-F/-R/-P. Une prise d'échantillon "eau" subira donc toutes les phases de l'analyse à partir de la préparation du mélange réactionnel de PCR pour vérifier l'absence de contamination lors de cette phase et lors du chargement des  $S_{ADN}$  dans les tubes individuels de PCR (2<sup>ème</sup> type de faux positifs).

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



## 6 Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

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 = $\pm 10\%$
Masse	EMT = 10%
Température	<b>incubateur</b> : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ <b>réfrigérateur</b> : $5^{\circ}\text{C}$ et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur) <b>congélateur</b> : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ en fonction de l'usage <b>thermocycleur*</b> : 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.*

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Appareil de PCR en temps réel et ordinateur de pilotage capables de mesurer la fluorescence des reporteurs de type « FAM » et « JOE » ou des fluorophores de spectre équivalent. Cette méthode a été initialement développée et validée sur un appareil Rotorgene 6500, Corbett Research.
- Broyeur de graines de volume de broyage adapté et capable d'homogénéiser un mélange d'échantillon de graines et de milieu liquide. Il est indispensable de posséder plusieurs bols de broyage identiques et entièrement stérilisables.
- Poste de sécurité microbiologique pour la préparation des prises d'essai.
- Hotte à flux laminaire ou poste de sécurité microbiologique pour préparation du mélange réactionnel et chargement des échantillons dans les tubes de PCR (si possible deux hottes ou postes séparés).
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à  $22\pm 6^{\circ}\text{C}$



## 7 Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

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

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse : Les échantillons sont constitués de semences de *Pinus* ou *Pseudotsuga menziesii*. Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis : Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis dans les cas où l'échantillon doit être pris en charge dans des conditions confinées.

Fiche de demande d'analyse : formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 21 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C. Les prises d'essai en microtubes peuvent être conservées congelées jusqu'à 3 mois avant analyse.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.



## 8 Mode opératoire

### 8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique. A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, un prélèvement d'environ 1000 graines est effectué de façon aléatoire, à l'aide d'outils de prélèvement préalablement désinfectés par flambage ou à l'hypochlorite de sodium. Le tableau en annexe I fournit un poids de mille grains moyen pour les espèces de *Pinus* et *Pseudotsuga* les plus fréquentes. Il est également possible de réaliser un prélèvement de l'équivalent de 1000 grains par pesée en préparant 3 séries de 10 graines, en les pesant, et en multipliant le poids moyen obtenu par 100. Une quantité de graines correspondant à ce poids de mille grains sera prélevée et pesée avec une erreur maximale tolérée de 0.5 g.

L'échantillon pour analyse est directement transféré dans un flacon plat de culture cellulaire stérilisé de volume adapté dans lequel on procédera à un enrichissement biologique.

### 8.2 Enrichissement biologique et broyage des prises d'essai

1. Etaler les graines sans prétraitement ni stérilisation externe dans le flacon plat de culture ou dans le sac plastique de manière à n'obtenir qu'une couche d'une graine d'épaisseur
2. Y rajouter la quantité de PD Broth suffisante pour que les graines soient pratiquement complètement immergées. Incuber les graines pendant 72 à 80 heures dans le milieu liquide PD Broth, à 22°C±6°C.
3. Après enrichissement, broyer l'ensemble des graines et le milieu d'enrichissement dans un bol de broyage du mixeur, jusqu'à obtenir un broyat liquide suffisamment homogène. A cette étape, il est possible de rajouter une quantité appropriée de PD Broth ou d'eau stérile au cours du broyage si le broyat est trop épais.
4. Prélever de façon aléatoire dans le broyat deux prises d'essai (a et b) d'environ 500 µl, en utilisant un cône de micropipette adapté (à tronquer si besoin) et transférer chaque prise d'essai dans un microtube stérile de 2 ml. A cette étape, environ 1000 µl de broyat doivent être prélevés en supplément, identifiés et conservés congelés en cas de nécessité de confirmation d'un positif par un laboratoire de référence.

### 8.3 Extraction de l'ADN total

1. Déposer et ouvrir le tube faisant office de témoin négatif de processus sur le plan de travail pendant toute la durée de la manipulation des échantillons.
2. Avant ouverture du microtube contenant la prise d'essai, centrifuger brièvement le microtube afin de recueillir toutes les particules constituant l'échantillon au fond du microtube et débarrasser le capuchon de tout reliquat d'échantillon.
3. Ajouter le volume de tampon de lyse préconisé par le fabricant de kit d'extraction d'ADN dans chaque tube de prise d'essai. Si un dosage au spectrophotomètre est prévu, il sera parfois nécessaire à cette étape d'ajouter la RNase, enzyme qui dégrade les molécules d'ARN. Le volume à ajouter est celui préconisé par le fabricant (fournie avec le kit d'extraction).
4. Ajouter 10 à 20 mg de PVPP en poudre





5. Incuber chaque tube environ 20 min à environ 65°C (ou à la température recommandée par le fabricant de kit d'extraction d'ADN). Pendant l'incubation, vortexer chaque tube à au moins une reprise pour ré-homogénéiser leur contenu qui aura tendance à sédimenter.
6. À la fin de l'incubation centrifuger les tubes environ 5 min à vitesse maximale. Prélever le surnageant pour poursuivre l'extraction.
7. Le surnageant prélevé est transféré dans un nouveau microtube stérile ou dans la première colonne de filtration du kit d'extraction d'ADN. Le microtube contenant le culot cellulaire est détruit. L'extraction d'ADN se poursuit ensuite en suivant les recommandations du fournisseur du kit d'extraction d'ADN.
8. À la fin du mode opératoire prescrit par le fabricant, l'ADN total est élué dans un volume final de 100 µl de tampon d'éluion. Cette solution d'ADN total constituera la solution (extrait) d'ADN directement analysée par PCR en temps réel ( $S_{ADN}$ ).

#### 8.4 Test de détection par PCR en temps réel

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

Le volume réactionnel est 20 µl : 18 µl de mélange réactionnel et 2 µl de  $S_{ADN}$  à tester. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Composé	Concentration finale
Eau Ultra Pure	qsp 18 µl
qPCR 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 FCIR-F	0.3 µM
Amorce antisens FCIR-R	0.3 µM
Sonde FCIR-P	0.1 µM

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 filtre.
4. Le microtube contenant le mix complet doit être passé au vortex pendant au moins 5 secondes avant sa distribution.
5. Le mix est distribué dans les microtubes de PCR à raison de 18 µl par microtube.





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

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  $\mu$ l par microtube de PCR à l'aide d'une micropipette munie d'un microcône stérile à embout filtre.
2. Les  $S_{ADN}$  des différents contrôles sont ajoutés et testées en *duplicata* :  $T_{-extr}$ ,  $T_{+LOD}$ , etc. Pour le T-, on substitue à la  $S_{ADN}$  2  $\mu$ l d'eau ultra pure. Il est recommandé d'ajouter les témoins positifs en fin de manipulation, après avoir refermé de façon étanche les tubes correspondants aux échantillons à tester.
3. Les microtubes sont transférés dans le bloc ou le rotor du thermocycleur.

### Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel FCIR-F/-R/-P

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

Etape		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation initiale et activation de la polymérase à ADN	95 °C *	10 min *	1
2	Dénaturation	95°C	15 sec	40
3	Hybridation - polymérisation	70°C	55 sec puis mesure de la fluorescence FAM	

\* Durée et température à adapter en fonction des recommandations du fournisseur

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

### Paramètres de l'amplification par PCR en temps réel 18S uni-F/-R/-P

Ce test sera réalisé en parallèle du test de détection de *F. circinatum*. La composition du mélange réactionnel est identique à celui indiqué pour la recherche de *F. circinatum*, en substituant simplement les amorces et la sonde FCIR-F/-R/-P par les amorces et la sonde 18S uni -F/-R/-P. Les conditions d'amplification sont identiques à celles employées pour la recherche de *F. circinatum*, mis à part la température d'hybridation/synthèse qui est fixée à 65°C et le nombre de cycles nécessaire fixé à 30. Les extraits d'ADN sont testés en *duplicata*.



## 9 Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par l'appareil de PCR en temps réel et générées à partir des différents témoins.

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

- Aucun des réplicats de T<sup>-extr</sup> n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination croisée accidentelle pendant la phase de broyage et d'extraction d'ADN de la série des échantillons analysés ou pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S<sub>ADN</sub>.
- Aucun des réplicats de T<sup>-</sup> (NTC) n'a généré de fluorescence « FAM » supérieure à la ligne de seuil déterminée => il n'y a pas eu de contamination accidentelle pendant la préparation du mélange réactionnel, son dépôt et l'ajout des S<sub>ADN</sub>.
- Les réplicats de T<sub>+LOD</sub> 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 *F. circinatum*.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne seraient pas respectées, l'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de l'analyse est à refaire.

### 9.2 Calculs et expression des résultats

Si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des S<sub>ADN</sub>, donc des prises d'essai et de leur réplicats, testés au cours de la même réaction de PCR.

Pour chacune des réactions de PCR, relever le Ct du contrôle T<sub>+LOD</sub> (=Ct<sub>LOD</sub>). Tous les extraits d'ADN testés lors de la réaction validée dont le Ct est inférieur à Ct<sub>LOD</sub> seront considérés comme positifs.

Pour chaque échantillon analysé, les résultats des deux prises d'essai « A » et « B » sont analysés individuellement avec comme règle de décision :

- Pour qu'un échantillon soit déclaré positif, il suffit qu'au moins une des deux prises d'essai soit positive. Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *F. circinatum* détecté dans l'échantillon analysé »
- Pour qu'un échantillon soit déclaré négatif, il faut que les deux prises d'essai soient négatives. Le résultat sera alors exprimé par une phrase du type « *F. circinatum* non détecté dans l'échantillon analysé ».
- Un échantillon sera déclaré de statut indéterminé si au moins une des deux prises d'essai est de statut indéterminé et l'autre non positive. Le résultat sera alors exprimé par « résultat indéterminé pour l'échantillon analysé », et il conviendra de mentionner la cause de l'indétermination (présence de composés inhibiteurs ou quantité d'ADN extrait insuffisante).

L'analyse individuelle des prises d'essai « A » et « B » est présentée en annexe 2 (tables décisionnelles).



## 10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critère de performance	Résultats obtenus																																
Caractéristiques de la réaction de PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'efficacité de la réaction monoplex sur une gamme d'extraits d'ADN génomique cible préparée dans de l'eau ultra-pure a été évaluée à 1,01 avec le Core kit No ROX (Eurogentec).</li> <li>Le <math>R^2</math> calculé pour la gamme est de 0,99.</li> </ul>																																
Sensibilité analytique	La sensibilité analytique a été estimée à 474 copies plasmidiques (cp) d'ADN cible par tube de PCR (soit 23,7 cp/ $\mu$ L) pour une réaction monoplex avec dilution dans de l'eau ultra-pure en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).																																
Spécificité analytique	<p>La spécificité analytique a été évaluée sur 9 isolats de <i>F. circinatum</i>, 58 isolats de champignons génétiquement proches de <i>F. circinatum</i> ou qui partagent les mêmes hôtes et sur 17 extraits d'ADN provenant de différents organes de végétaux sains, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% spécifique.</p>																																
Inclusivité	<p>L'inclusivité du test PCR en temps réel a été démontrée in silico par blast sur la base de données GenBank et in vitro sur une gamme d'isolats de <i>F. circinatum</i> (9 isolats) de différentes provenances géographiques, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec).</p> <p>Lors de cette caractérisation le test a été 100% inclusif.</p>																																
Répétabilité et reproductibilité	<p>La répétabilité et la reproductibilité ont été évaluées sur 10 réplicats d'une solution plasmidique calibrée dosée à 3 concentrations dont une proche de la limite de détection et sur 10 réplicats d'ADN extrait d'un échantillon de semences de pin naturellement contaminé, en utilisant le Core kit No ROX (Eurogentec). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Cible</th> <th rowspan="2">concentration (en copies plasmidiques)</th> <th colspan="2">CV (%)</th> <th colspan="2">résultat qualitatif</th> </tr> <tr> <th>répétabilité</th> <th>reproductibilité</th> <th>répétabilité</th> <th>reproductibilité</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">Solution plasmidique</td> <td>47400</td> <td>0.61</td> <td>5.38</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>4740</td> <td>0.90</td> <td>5.06</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>474 (LOD)</td> <td>2.37</td> <td>5.10</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Echantillon</td> <td>nd</td> <td>0.51</td> <td>5.79</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> <p>Les résultats qualitatifs sont 100% positifs. Les coefficients de variations sont tous inférieurs à 10%. Le test est donc répétable et reproductible.</p>	Cible	concentration (en copies plasmidiques)	CV (%)		résultat qualitatif		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité	Solution plasmidique	47400	0.61	5.38	+	+	4740	0.90	5.06	+	+	474 (LOD)	2.37	5.10	+	+	Echantillon	nd	0.51	5.79	+	+
Cible	concentration (en copies plasmidiques)			CV (%)		résultat qualitatif																											
		répétabilité	reproductibilité	répétabilité	reproductibilité																												
Solution plasmidique	47400	0.61	5.38	+	+																												
	4740	0.90	5.06	+	+																												
	474 (LOD)	2.37	5.10	+	+																												
Echantillon	nd	0.51	5.79	+	+																												



## Annexe 1 : poids de mille grains

Poids de mille grains moyen pour les principales espèces de *Pinus* et *Pseudotsuga menziesii*

Espèce	Poids de mille grains moyen (g)	Espèce	Poids de mille grains moyen (g)
<i>Pinus aristata</i>	22	<i>Pinus mugo</i> subsp. <i>pumilio</i>	6
<i>Pinus armandi</i>	245	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>koekelare</i>	21
<i>Pinus banksiana</i>	4	<i>Pinus nigra</i> var. <i>austriaca</i>	20
<i>Pinus bungeana</i>	130	<i>Pinus nigra</i> var. <i>calabrica</i>	18
<i>Pinus brutia</i>	53	<i>Pinus nigra</i> var. <i>corsicana</i>	15
<i>Pinus canariensis</i>	120	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>salzmannii</i>	16
<i>Pinus cembra</i>	350	<i>Pinus palustris</i>	75
<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i>	5	<i>Pinus parviflora</i>	125
<i>Pinus coulteri</i>	330	<i>Pinus pinaster</i>	55
<i>Pinus eldarica</i>	62	<i>Pinus pinea</i>	895
<i>Pinus densiflora</i>	18	<i>Pinus ponderosa</i>	42
<i>Pinus gerardiana</i>	295	<i>Pinus pumila</i>	105
<i>Pinus griffithi</i>	58	<i>Pinus radiata</i>	29
<i>Pinus halepensis</i>	18	<i>Pinus rigida</i>	7
<i>Pinus jeffreyi</i>	110	<i>Pinus strobus</i>	14
<i>Pinus koraiensis</i>	460	<i>Pinus sylvestris</i>	7
<i>Pinus lambertiana</i>	300	<i>Pinus tabuliformis</i>	32
<i>Pinus leucodermis</i>	25	<i>Pinus taeda</i>	27
<i>Pinus montana uncinata</i>	9	<i>Pinus thunbergii</i>	14
<i>Pinus uncinata</i>	19	<i>Pinus wallichiana</i>	50
<i>Pinus mugo</i> subsp. <i>mugo</i>	7	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	13



## Annexe 2 : Tables décisionnelles

Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
2	+/+	+/-	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
3	+/+	-/-	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
4	+/-	+/-	Refaire test FCIR sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <b>F. circinatum</b> détecté dans E</li> <li>• Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B (Table B)</li> </ul>
5	+/-	-/-	Refaire test FCIR sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <b>F. circinatum</b> détecté dans E</li> <li>• Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B (Table B)</li> </ul>
6	-/-	-/-	Procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B	Cf Table B

Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	FIN	<b>F. circinatum</b> non détecté dans E
2	+/+	+/-	Refaire les tests FCIR et 18S uni sur S <sub>ADN</sub> B diluée au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table A' et uniquement interpréter les résultats pour la S <sub>ADN</sub> B diluée au 1/10 <sup>e</sup>
3	+/+	-/-	Refaire les tests FCIR et 18S uni sur S <sub>ADN</sub> B diluée au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table A' et uniquement interpréter les résultats pour la S <sub>ADN</sub> B diluée au 1/10 <sup>e</sup>
4	+/-	+/-	Refaire les tests FCIR et 18S uni sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table A'
5	+/-	-/-	Refaire les tests FCIR et 18S uni sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table A'
6	-/-	-/-	Refaire les tests FCIR et 18S uni sur S <sub>ADN</sub> A et S <sub>ADN</sub> B diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table A'



**Table A'**  
Test FCIR sur solutions diluées au 1/10<sup>e</sup>

Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
2	+/+	+/-	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
3	+/+	-/-	FIN	<b>F. circinatum</b> détecté dans E
4	+/-	+/-	Refaire test FCIR sur S <sub>ADNA</sub> et S <sub>ADNB</sub> diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none"><li>• Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <b>F. circinatum</b> détecté dans E</li><li>• Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B (Table B)</li></ul>
5	+/-	-/-	Refaire test FCIR sur S <sub>ADNA</sub> et S <sub>ADNB</sub> diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Suite au nouveau test FCIR : <ul style="list-style-type: none"><li>• Si résultat 1, 2, 3 ou 4 obtenu : <b>F. circinatum</b> détecté dans E</li><li>• Si résultat 5 ou 6 obtenu, procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur les prises d'essai A et B (Table B)</li></ul>
6	-/-	-/-	Procéder à l'interprétation des résultats du test 18S uni sur S <sub>ADNA</sub> et S <sub>ADNB</sub> diluées au 1/10 <sup>e</sup>	Cf Table B'

**Table B'**  
Test 18S uni sur solutions diluées au 1/10<sup>e</sup>

Type résultat	Prise d'essai A	Prise d'essai B	Action	Interprétation / démarche à suivre
1	+/+	+/+	FIN	<b>F. circinatum</b> non détecté dans E
2	+/+	+/-	FIN	<b>F. circinatum</b> non détecté dans E
3	+/+	-/-	FIN	<b>Résultat indéterminé pour E.</b> Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)
4	+/-	+/-	FIN	<b>Résultat indéterminé pour E.</b> Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)
5	+/-	-/-	FIN	<b>Résultat indéterminé pour E.</b> Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)
6	-/-	-/-	FIN	<b>Résultat indéterminé pour E.</b> Préciser la cause de l'indétermination (quantité d'ADN insuffisante* ou présence d'effet inhibiteur)

\*Si l'échantillon le permet, refaire de nouvelles prises d'essai.



## Bibliographie

- Iloos 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.