

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV MA 005 - Version 4

Mars 2017

Détection du Banana bract mosaic potyvirus (BBrMV) sur bananier par IC-RT-PCR conventionnelle

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence pour la détection des virus sur plantes tropicales

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



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.

Tableau 1 : Historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
Version 1a *	Sans objet	Juin 2010	Version initiale
Version 2a	Majeure	Septembre 2010	La proportion entre matériel végétal frais et tampon d'extraction a été modifiée au paragraphe 7.2.2. car les proportions indiquées dans la version précédente étaient erronées. Cette modification fait suite aux remarques reçues dans le cadre de la consultation publique sur la version 1.
Version 3a **	Majeure	Octobre 2012	Modification de la proportion entre matériel végétal frais et tampon d'extraction (§7.2.2). Différentes possibilités de durée d'incubation sont ajoutées pour apporter plus de flexibilité dans la réalisation des analyses.
Version 4	Mineure	Mars 2017	Mise au format Anses de la MOA 005 partie A Pas de modification sur le fond de la méthode. Ajout de la précision « PCR conventionnelle » au titre de la méthode et à chaque fois que la technique IC-RT-PCR est citée (notamment au § 9.2), afin de la distinguer de l'IC-RT-PCR temps réel. Ajout des §6.2, 7.2, 7.3 et 10. Modifications apportées sur le schéma de la méthode (§4) en reprenant uniquement ce qui relève de la présente méthode (suppression de la référence à la méthode de PCR temps réel). Des précisions / modifications sont apportées aux §8.2.2, §8.2.3 et §8.3.1.

* Une consultation publique de la méthode (notamment auprès des laboratoires agréés français) a été organisée dans sa version 1a d'avril 2010 à juin 2010.

** Une consultation publique de la méthode (notamment auprès des laboratoires agréés français) a été organisée dans sa version 3a d'avril 2012 à fin mai 2012.



Avant-propos

La méthode a été caractérisée et validée par l'unité « Bactériologie-virologie-OGM » du Laboratoire de la Santé des Végétaux et complétée par l'unité « Ravageurs et pathogènes tropicaux » du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV-RAPT), Laboratoire National de Référence (LNR) pour la détection du Banana bract mosaic virus.

Adresse : Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – unité RAPT
3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre

Contact : saint-pierre.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation initiale (rapport d'évaluation BBrMV_2009) et à un rapport de validation complémentaire (rapport BBrMV_octobre 2011).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application.....	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode.....	8
5 Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Réactifs sérologiques et de biologie moléculaire	9
5.2.1 Immunocapture	9
5.2.2 Réactifs RT-PCR	9
5.3 Tampons	10
5.4 Autres réactifs et consommables	10
5.5 Contrôles et témoins	10
6 Appareillage et matériels	11
6.1 Broyeur	11
6.2 Thermocycleur	12
7 Échantillons.....	12
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.....	12
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	12
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
8 Mode opératoire	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	13
8.2 Immunocapture	14
8.2.1 Coating.....	14
8.2.2 Broyage de l'échantillon	14
8.2.3 Clarification des extraits	14
8.2.4 Lavage.....	14
8.2.5 Dépôt des échantillons.....	15
8.2.6 Lavage.....	15
8.3 RT-PCR conventionnelle : mélange réactionnel et amplification	15
8.3.1 Mélange réactionnel et amplification	15
8.3.2 Electrophorèse et révélation	16
9 Résultats	17
9.1 Contrôle de la validité des résultats	17
9.2 Calculs et expression des résultats.....	17
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Bibliographie	19



Introduction

La mosaïque des bractées du bananier est une maladie grave des bananiers dont l'agent causal est le Banana bract mosaic potyvirus (virus à ARN) ou BBrMV.

La méthode décrite dans ce document permet de détecter spécifiquement le virus responsable de la mosaïque des bractées du bananier. Elle est basée sur des techniques mixtes d'immunologie et d'amplification génique des séquences spécifiques du BBrMV (Iskra-Caruana, Galzi, and Laboureau 2008).

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



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement, l'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté doivent être détruits par autoclavage ou autre moyen inactivant les virus.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté doit être désinfecté.



1 Objet et domaine d'application

Objet

La méthode permet de détecter la présence du BBrMV sur bananier par la technique d'immunocapture-reverse transcription-PCR (IC-RT-PCR) conventionnelle.

Domaine d'application

La méthode s'applique sur feuilles ou bractées de bananiers, fraîches ou déshydratées, symptomatiques ou asymptomatiques.

2 Documents de référence

Tableau 2 : Liste des documents de référence (hors bibliographie).

	Référence	Titre
1	MOA 008	Méthode officielle d'analyse « Technique ELISA Bactériologie/Virologie »
2	MOA 022	Méthode officielle d'analyse « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection et identification des organismes phytopathogènes »
3	MOA GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au Laboratoire de la santé des végétaux
4	Rapport d'évaluation BBrMV_2009	Évaluation des différentes techniques de détection du Banana Bract Mosaic Virus (BBrMV) sur bananier.
5	Rapport BBrMV octobre 2011	Dossier de validation complémentaire sur les modifications apportées à la version 2a

3 Termes, sigles et définitions

Les termes employés dans la méthode sont issus des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire MOA 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.

Les sigles sont explicités au fur et à mesure du texte.



4 Principe de la méthode

La technique IC-RT-PCR conventionnelle associe une capture immunologique des particules virales et une amplification enzymatique des séquences spécifiques du BBrMV par PCR conventionnelle.

Il s'agit d'une méthode qualitative, c'est à dire dont la réponse est soit la présence, soit l'absence de l'organisme cible détecté dans une quantité d'échantillon donnée.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.

La méthode peut être schématisée de la façon suivante :

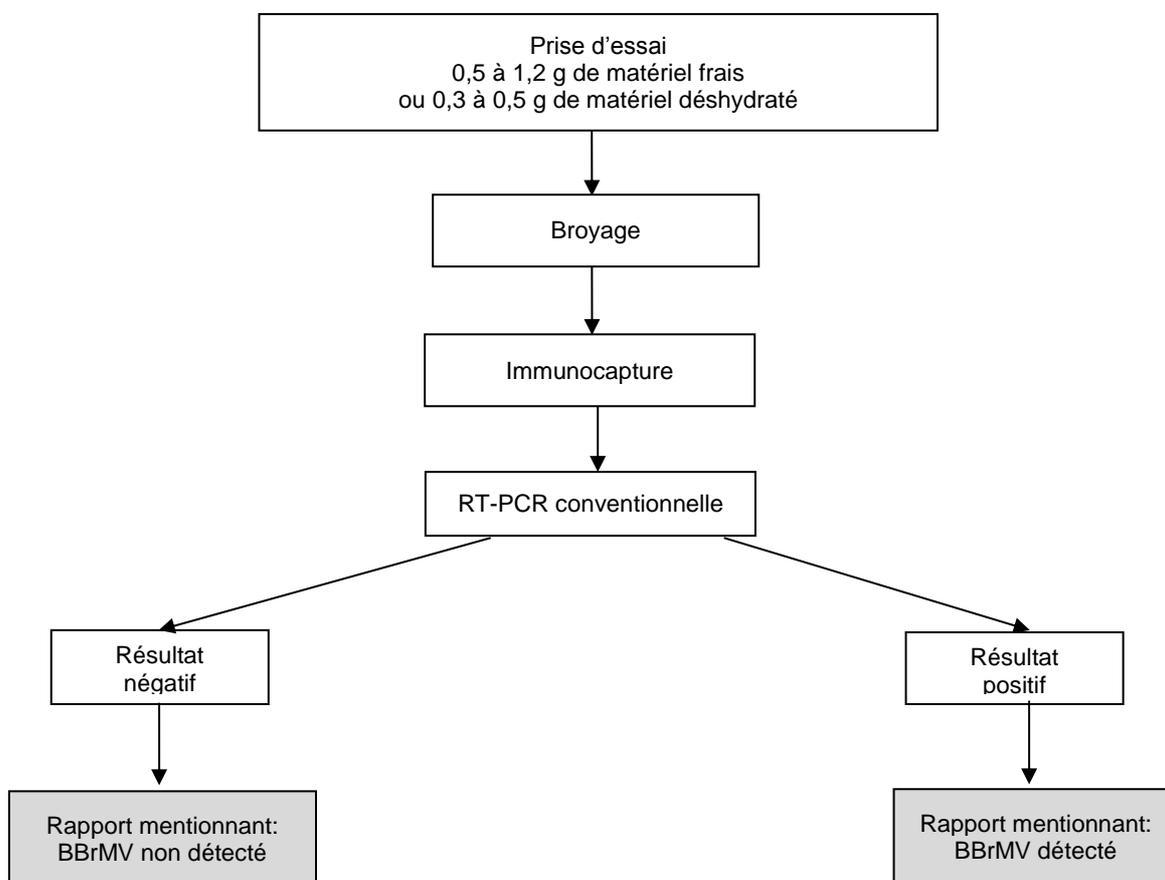


Figure 1 : Principe de la détection du BBrMV selon la MA 005.



5 Réactifs

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

En règle générale, l'utilisateur 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 contaminations ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

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

5.1 Eau

L'eau doit être de qualité « analytique » (i.e. déminéralisée, distillée, osmosée,...) garantissant d'atteindre les critères de performance attendus pour les tests.

L'eau utilisée pour les étapes de PCR (préparation des mix, dilution des amplifiats) doit présenter une qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (eau ultrapure).

5.2 Réactifs sérologiques et de biologie moléculaire

5.2.1 Immunocapture

Le laboratoire utilisera des réactifs sérologiques spécifiques du BBrMV. La présente méthode a été caractérisée et validée avec les réactifs sérologiques AGDIA.

Les réactifs sérologiques sont des réactifs critiques. Ils doivent faire l'objet de contrôles avant (ou parallèlement à) leur première utilisation conformément aux préconisations de la MOA 008.

5.2.2 Réactifs RT-PCR

Certains réactifs sont critiques et conditionnent la performance de l'amplification (mastermix ou core kit commercial de reverse transcriptase et de polymérase thermostable, dNTP, amorces, sondes, eau de qualité ultrapure).

Ces réactifs doivent être utilisés et, pour certains, contrôlés conformément à la méthode d'analyse MOA 022. Le BBrMV étant un virus à ARN, ce dernier doit au préalable être transcrit en ADNc avant d'être amplifié (Reverse Transcription).

La présente méthode a été validée avec le kit réactionnel de RT-PCR Qiagen OneStep RT-PCR®.

L'amplification spécifique de l'ADNc du BBrMV est réalisée grâce au couple d'amorces suivant :

Tableau 3 : Séquences des amorces.

Amorces	Séquence (5'-3')	Taille du fragment généré
BRACT N2	ACA TGG AGT ATG GAT AAGG	260 pb
BRACT NR :	GTG TGC YTC TCT AGC CCT GTT	



5.3 Tampons

5.3.1 Composition et préparation

La liste des tampons nécessaire à la mise en œuvre de la méthode est la suivante :

- tampon de broyage type GEB ou PBS-T-PVP (20%) ;
- tampon de coating ou tampon carbonate ;
- tampon de lavage type PBS-T 1X ;
- tampon de migration (par exemple, TBE 10X ou TAE 10X) ;
- tampon de charge

Les tampons utilisés doivent être ceux préconisés par le fournisseur de réactifs.

5.3.2 Conservation

Les préparations des tampons ainsi que leurs durées et conditions de conservation doivent être conformes aux recommandations du fournisseur. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il juge optimales.

5.4 Autres réactifs et consommables

Parmi les consommables spécifiques, il faut utiliser des consommables exempts de RNase et DNase.

- Microcônes stériles avec et sans filtre de volume adaptés
- Microtubes stériles de volume adaptés
- Microtubes, barrettes ou pour plus de facilité de manipulation, des plaques stériles pour PCR de volume adapté au thermocycleur utilisé

Ethanol 70° (et éventuellement un produit détergent désinfectant de type Aniospray) : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors des étapes de prise d'essai, de broyage et d'immunocapture.

Produits de décontamination de type DNA Away : désinfection des surfaces de travail et du matériel lors de la mise en œuvre des tests de biologie moléculaire.

5.5 Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Conformément aux exigences de la méthode d'analyse MOA 022, ces références sont constituées de :

- un contrôle positif de processus (T +) : matrice contenant l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser et déclarée contaminée à l'issue de la manipulation (tissu de bananier infecté).
Ce contrôle donne au minimum l'assurance d'un déroulement correct de la manipulation. Pour chaque série d'analyses, on peut soit utiliser des échantillons végétaux contaminés (si possible *Musa spp*) préparés au laboratoire (échantillons de référence naturellement contaminés) ou des témoins commerciaux positifs (lyophilisés, glycérolés...) à préparer selon les recommandations du fournisseur ;
- un contrôle négatif de processus (T -) : matrice ne contenant pas l'organisme cible, traitée dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser et déclarée non contaminée à l'issue de la manipulation (tissu de bananier sain).



- un contrôle négatif de RT-PCR (A -) : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ARN n'est ajouté, uniquement de l'eau ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de RT-PCR.

D'autres contrôles peuvent être ajoutés si nécessaire et sont définis par la MOA 022 (exemple : contrôles positif de PCR).

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.

Pour la mise en œuvre de cette méthode, le laboratoire disposera des appareils décrits dans la méthode d'analyse MOA 022.

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).

Tableau 4 : EMT par grandeur.

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10mL : EMT = $\pm 10\%$ volume \geq à 10mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 unité pH
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^\circ\text{C}$ réfrigérateur : EMT = $\pm 4^\circ\text{C}$ (pour une température cible de $+5^\circ\text{C}$) thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^\circ\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^\circ\text{C}$
Temps	EMT = 10%

**Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA 022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.*

6.1 Broyeur

La méthode a été validée en utilisant, pour la matrice végétale de type feuille ou bractée un broyeur à bille (type Homex 6 de Bioreba), le broyage de l'échantillon se faisant dans un sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon. Le broyat peut alors être récupéré directement dans le sachet. Toutefois, tout autre procédé de broyage permettant d'obtenir des résultats équivalents peut également être utilisé.



6.2 Thermocycleur

La méthode a été évaluée sur thermocycleur Veriti™ Thermal Cycler de Applied Biosystems et sur GeneAmp® PCR System9700 de Applied Biosystems. D'autres thermocycleurs permettant d'obtenir des résultats équivalents peuvent être utilisés.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons.

Les échantillons reçus pour analyse doivent être dans un bon état de conservation, c'est-à-dire, ni desséchés, ni nécrosés ni en cours de décomposition. Si les échantillons arrivent au laboratoire dans un état dégradé, le laboratoire émet des réserves sur tout résultat d'analyse négatif en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. Si les échantillons arrivent dans un état très dégradé, le laboratoire peut refuser l'analyse. Le refus d'analyse doit être motivé et doit être notifié au client dans les plus brefs délais.

Par ailleurs, la quantité de matériel végétal réceptionné doit être suffisante pour permettre la prise d'essai.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS (Bos 1983)), la prise d'essai est constituée de 0,3g de matériel végétal déshydraté et au maximum de 0,5g de matériel végétal déshydraté.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée de 0,5g de matériel végétal frais et au maximum de 1,2g de matériel végétal frais.

Si la quantité de matériel végétal reçue au laboratoire est insuffisante, des réserves sont émises quant au résultat d'analyse si ce dernier est négatif.

Le traitement individuel des échantillons doit être privilégié, notamment en présence d'échantillons asymptomatiques. Le regroupement par lot peut avoir des conséquences sur la sensibilité analytique de la méthode, ce mode d'analyse doit donc être choisi en connaissance de cause par le client. Il doit être mis en œuvre uniquement avec l'accord préalable, explicite et éclairé du demandeur d'analyse qui doit lui-même définir la conduite à tenir en cas de résultat positif sur le lot (par exemple, refaire une analyse individuelle).

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai maximum entre la réception de l'échantillon et le début de l'analyse doit être de préférence inférieur à 3 jours et ne doit pas dépasser 5 jours pour les échantillons frais prélevés dans de bonnes conditions et conservés à l'abri de la dessiccation, et de 3 à 4 semaines pour les échantillons déshydratés. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à +5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité (cf. tableau ci-après), jusqu'à au moins le quinzième jour calendaire suivant l'envoi au demandeur du rapport d'analyse. Dans le cas d'un résultat positif ou indéterminé, ce délai est prolongé à 12 mois pour les reliquats qui le permettent selon les modalités détaillées dans le tableau ci-après.



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 ou une analyse de confirmation.

Tableau 5 : Types de reliquats d'échantillons à conserver et conditions de leur conservation pour les besoins d'analyses contradictoires et /ou de confirmation.

Etape	Type de reliquat	Conservation		Modalités d'envoi à un autre laboratoire le cas échéant
		Conditions	Durée	
Prise d'essai	Matériel végétal frais	+5°C	Tout résultat : 15 jours après envoi du rapport	Sachets individuels fermés et clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
	Matériel végétal déshydraté	Dans un environnement sec (exemple: en boîte hermétique) à température ambiante, ou en conditions réfrigérées	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	Tubes/ pots hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
Broyage	Broyat végétal	≤-18°C	Résultat négatif : 15 jours après envoi du rapport	Tubes hermétiques clairement identifiés Température ambiante Transporteur express avec suivi
			Résultat positif ou indéterminé : 12 mois après envoi du rapport	

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

L'utilisateur opérera selon une procédure adaptée à son contexte (infrastructures, organisation) qui vise à éviter tout risque de confusion entre échantillons ou de contamination d'un échantillon par un autre. Entre chaque prise d'essai, l'utilisateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Le préparateur veillera à prélever les tissus les mieux conservés.

1) Le traitement individuel des échantillons.

Pour le matériel frais, chaque prise d'essai est constituée au minimum de 0,5g et au maximum de 1,2g de matériel végétal.

Pour le matériel déshydraté (échantillons lyophilisés ou en BOS), la prise d'essai est constituée au minimum de 0,3g et au maximum de 0,5g de matériel végétal.

2) Cas du regroupement par lot.

En cas de regroupement d'échantillons (au maximum 5), il est nécessaire d'adapter les pesées individuelles de façon à ce que la pesée globale soit comprise dans l'intervalle préconisé pour le traitement individuel des échantillons.

Par exemple pour un regroupement de 2 échantillons frais : peser au minimum 0,25g par échantillon ($2 \times 0,25 = 0,5g$ ce qui correspond à la borne inférieure pour le traitement en individuel) et au maximum 0,6g par échantillon ($2 \times 0,6g = 1,2g$ ce qui correspond à la borne supérieure pour le traitement en individuel).



Suite à la prise d'essai, les reliquats de matériel végétal sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

8.2 Immunocapture

8.2.1 Coating

Établir soigneusement le plan de distribution (plan de plaque) et d'identification des extraits. Chaque échantillon (prise d'analyse) est au moins répété 1 fois soit 2 puits par échantillon.

Déposer dans chaque puits 30µL de sérum anti-BBrMV dilué au 1/200ème dans du tampon de coating. Fermer les puits. Dans la mesure du possible, effectuer une petite centrifugation afin de culoter le coating.

Incuber dans une boîte hermétique « humide » pendant 4h à +37°C ou selon les recommandations du fournisseur de sérum (par exemple une nuit à +5°C).

8.2.2 Broyage de l'échantillon

Ajouter le tampon de broyage pour obtenir une dilution au 1/10^{ème} de l'échantillon considéré frais selon les recommandations suivantes :

Tableau 6: Volume de tampon à ajouter selon le type d'échantillons et la masse du mélange. .

Type d'échantillon	Nature d'échantillon	Masse du mélange	Volume de tampon à ajouter
Déshydraté	Feuilles	0,5 g	12,5 mL
		0,3 g	7,5 mL
	Bractées	0,5 g	21,0 mL
		0,3 g	12,6 mL
Frais	Feuilles ou bractées	1,2 g	10,8 mL
		0,5 g	4,5 mL

Broyer jusqu'à obtention d'un mélange homogène à l'aide d'un broyeur à billes.

Les broyats obtenus doivent être conservés à +5°C et utilisés le plus vite possible (au plus tard dans la journée). Après dépôt, les broyats sont conservés selon les modalités indiquées dans le tableau 5.

8.2.3 Clarification des extraits

Transférer le broyat dans des tubes de type Eppendorf en laissant environ 1 cm de vide pour une éventuelle congélation.

Centrifuger à 8 000 g pendant 5 minutes en conditions réfrigérées (par exemple à +4°C).

8.2.4 Lavage

A l'issue du coating, faire 4 rinçages de la plaque ou des barrettes avec 100 µL de tampon de lavage par puits.

Éliminer le liquide de lavage et sécher par retournement sur du papier absorbant.



8.2.5 Dépôt des échantillons

Pour chaque échantillon, un minimum de 2 dépôts doit être réalisé pour la recherche du BBrMV.

Déposer 25 μL du surnageant (§8.2.3) par puits. Fermer les puits. Dans la mesure du possible, effectuer une petite centrifugation afin de « fixer » le broyat au fond des puits.

Incuber une nuit à +5°C dans une boîte hermétique « humide » ou selon les recommandations du fournisseur de sérum (par exemple 2h à température ambiante).

Remarque : A partir de cette étape, porter des gants pour éviter la dégradation des ARN.

8.2.6 Lavage

Faire 4 rinçages avec 100 μL de tampon de lavage par puits pour éliminer les débris végétaux.

Faire 2 rinçages avec 100 μL d'eau RNase free pour éliminer les sels de tampon pouvant inhiber les enzymes du mélange réactionnel.

8.3 RT-PCR conventionnelle : mélange réactionnel et amplification

8.3.1 Mélange réactionnel et amplification

Remarque : Pendant toute la préparation de la réaction, le port des gants est obligatoire et l'ensemble des réactifs doit être maintenu au froid (glace ou utilisation de portoirs réfrigérés) pour limiter la dégradation des ARNs.

Constituer le mélange réactionnel suivant pour un volume total de 25 μL .

Tableau 7 : Mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Concentration finale	A titre indicatif (pour un volume total de 25 μL par microtube)	
		Concentration initiale	Volume /microtube (en μL)
Eau ultra pure			16,5
Tampon	1X	5X	5,0
dNTP	0,2 mM	10 mM	0,5
Amorce Bract NR	0,40 μM	10 μM	1,0
Amorce Bract N2	0,40 μM	10 μM	1,0
RT/Taq mix			1,0

Déposer 25 μL par puits dans les tubes coatés préparés à l'étape d'immunocapture.

Remarque : Dans le cas des témoins PCR, des tubes non coatés sont employés, 22 μL de mix sont déposés auxquels sont ajoutés 3 μL de matrice (ARN ou eau).

Dans la mesure du possible, effectuer une petite centrifugation afin de « fixer » le mélange réactionnel au fond des puits.

Programmer le thermocycleur de la manière suivante :

**Tableau 8** : Programme d'amplification.

	Température (°C)	Durée	Cycles
Reverse transcription	50	30 min	
Activation Hot Start - Dégradation reverse transcriptase	94	15 min	
Dénaturation	94	1 min	30
Hybridation	57	1 min	
Elongation	72	30 sec	
Elongation finale	72	5 min	
Conservation	12	∞	

8.3.2 Electrophorèse et révélation

Déposer environ 10 µL de l'amplifiât mélangé à du bleu de charge (environ 2µL pour 10µL d'amplifiât) sur un gel d'agarose à 1,5% (valeurs indicatives).

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

Effectuer l'électrophorèse (à titre indicatif, 100 volts durant 1h) dans du tampon de migration à concentration identique à celui utilisé pour réaliser le gel.

Une fois l'électrophorèse finie, colorer le gel dans un bain de bromure d'éthidium (BET) et révéler sous UV. Le BET est très fréquemment utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL. Cette solution doit être protégée de la lumière. Après coloration, rincer le gel à l'eau (sans chlore).

Il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel et d'utiliser une impression papier ou le fichier informatique pour analyser les résultats.

D'autres marqueurs d'ADN équivalents au BET peuvent également être utilisés.

Remarque : Veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau). Veiller également à la protection des utilisateurs lors de la manipulation du BET ou tout autre marqueur d'ADN par le port de gants nitriles. Tous les déchets ayant été en contact avec ces marqueurs d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.



9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'observation et conformité à l'attendu des résultats obtenus sur les témoins décrits au §5.5 sont un préalable à l'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons soumis à analyse.

L'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées.

Tableau 9 : Résultats attendus pour les différents témoins utilisés.

Type de contrôle	Résultat attendu
Contrôle négatif de processus (T -)	NEGATIF
Contrôle négatif de RT-PCR (A -)	NEGATIF
Contrôle positif de processus (T +)	POSITIF

9.2 Calculs et expression des résultats

L'analyse est qualitative. Le test est négatif pour les échantillons ne présentant aucune bande à la taille attendue. Le test est positif pour les échantillons présentant une bande à la taille attendue (260 pb).

Les résultats s'interprètent de la manière suivante :

Tableau 10 : Interprétation des résultats des échantillons.

Analyse		Résultat
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NEGATIF

Expression des résultats

Résultat Positif : « Banana bract mosaic virus détecté dans l'échantillon analysé selon la technique IC-RT-PCR conventionnelle ».

Résultat Négatif : « Banana bract mosaic *virus* non détecté dans l'échantillon analysé selon la technique IC-RT-PCR conventionnelle ».

Reliquats d'échantillons: cf. §7.3.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du rapport de validation établi par le LSV sous la référence BBrMV_2009.

Tableau 11 : Synthèse des caractéristiques de performance de détection du BBrMV par IC-RT-PCR conventionnelle.

Caractéristique	Paramètre	Résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Sensibilité	Pourcentage d'échantillons détectés parmi les échantillons cibles	98%	15 échantillons cibles * 4 réplicats + 1 échantillon cible * 24 réplicats (+ 10 modalités de regroupements * 4 réplicats + 15 modalités de regroupements * 3 réplicats)
Spécificité	Pourcentage d'échantillons non détectés parmi les échantillons non-cibles	99%	46 échantillons non-cibles * 4 réplicats
Exactitude	Pourcentage de vrais positifs et de vrais négatifs parmi des échantillons cibles et des échantillons non-cibles	99%	15 échantillons cibles * 4 réplicats + 1 échantillon cible * 24 réplicats (+ 10 modalités de regroupements * 4 réplicats + 15 modalités de regroupements * 3 réplicats) + 46 échantillons non-cibles * 4 réplicats
Seuil de détection	Niveau de concentration le plus bas pour lequel 99% des résultats sont positifs	1/20.SM*	Différents échantillons cibles, 3 niveaux de dilution, <i>a minima</i> 2 réplicats, selon les modalités de l'annexe 7 du rapport de validation BBrMV_2009.
Répétabilité	Pourcentage d'accords entre réplicats pour les mêmes échantillons	99%	Différents échantillons cibles, 3 niveaux de dilution, selon les modalités de l'annexe 7 du rapport de validation BBrMV_2009.

*SM=broyat dans le ratio 1/10 en frais sur feuilles (par exemple 0,5g de matériel végétal pour 4,5mL de tampon de broyage).



Bibliographie

- Bos, L. 1983. "Order out of chaos: Preservation in BOS." In *Introduction to plant virology*, 160. Wageningen, Netherlands.
- Iskra-Caruana, M. L., S. Galzi, and N. Laboureau. 2008. "A reliable IC One-step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of Musa germplasm." *J Virol Methods* 153 (2):223-31. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.06.028.